

UNTERSUCHUNGEN ZUR PRIMÄR- STRUKTUR DER α -UNTEREINHEIT DER DNA-ABHÄNGIGEN RNA-POLYMERASE VON E. COLI

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Ehrhardt
aus Wilhelmshaven

München 1978

1979

UNTERSUCHUNGEN ZUR PRIMÄR- STRUKTUR DER α -UNTEREINHEIT DER DNA-ABHÄNGIGEN RNA-POLYMERASE VON E. COLI

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Wolfgang Ehrhardt

aus Wilhelmshaven

München 1978



1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Zillig
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.7.1979

Für Isolde

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W. Zillig am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

Herrn Professor Zillig danke ich sehr herzlich für die großzügige Förderung der Arbeit.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für ein Promotionsstipendium.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	4
I. Aminosäuresequenzstudien an der α -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase	4
1. Einleitung	4
2. Isolierung und Charakterisierung von Bromcyan- peptiden	5
2.1. Isolierung der Bromcyanpeptide	5
2.2. Charakterisierung der Bromcyanpeptide	7
2.3. Sequenzanalysen	9
3. Zuordnung der Bromcyanpeptide zueinander	11
3.1. Einleitung	11
3.2.1. Tryptischer Verdau von α	12
3.2.2. Isolierung methioninhaltiger tryptischer Peptide	16
3.2.3. Charakterisierung der Peptide Ta-6, Tb-3, Te-5 und Te-8	17
3.3. Zuordnung der tryptischen Peptide zu Bromcyanpeptiden	18
3.3.1. Einleitung	18
3.3.2. Nachspaltung der Peptide Ta-6 und Tb-3 mit BrCN	18
3.3.3. Zuordnung von Ta-6 und Tb-3 zu tryptischen Fragmenten aus Bromcyanpeptiden	20
4. Zusammenfassung und Diskussion	23
II. Vergleichende proteinchemische Analyse von T4- modifizierter und T4-alterierter DNA-abhängiger RNA-Polymerase	27
1. Einleitung	27
2. Proteinchemische Analyse von T4-modifizierter DNA-abhängiger RNA-Polymerase	28
2.1. Einführung	28

2.2. Untersuchungen an tryptisch verdauter modifizierter α -Untereinheit	29
2.2.1. Tryptische Spaltung von modifiziertem α	31
2.2.2. Isolierung und Charakterisierung des modifizierten tryptischen Peptids	33
2.3. Thermolytische Spaltung von M-T IV	36
2.3.1. Isolierung und Charakterisierung von Th-2-b	38
2.3.2. Isolierung und Charakterisierung von Th-4-c-1	39
2.3.3. Isolierung und Charakterisierung von Th-6-a-1	40
2.4. Sequenzanalysen und Diskussion	42
3. Proteinchemische Analyse T4-alterierter DNA-abhängiger RNA-Polymerase	46
3.1. Einführung	46
3.2.1. Tryptische Spaltung von alteriertem α	47
3.2.2. Isolierung und Charakterisierung der alterierten tryptischen Peptide	48
3.3. Zusammenfassung und Diskussion	50
4. Diskussion von Teil II	53
C. MATERIAL UND METHODEN	53
I. Material	58
1. Substanzen	58
2. Lösungen	59
II. Methoden	60
1. Analytische Methoden	60
a. RNA-Synthesetest	60
b. Test der Alterationsreaktion	61
c. Dünnschichtchromatographische Methoden	61
d. Elektrophoretische Trennmethode	61
e. Analytischer Fingerprint	62
f. Endgruppenbestimmung mit Dansylchlorid	62

	Seite
g. Aminosäureanalysen	62
h. Sequenzanalysen	63
i. Standardproteinbestimmungen	64
k. Proteinbestimmungen mit Ninhydrin	64
2. Präparative Methoden	64
a. Isolierung der RNA-Polymerase aus E.coli	64
b. Gewinnung von T4-infizierten Bakterien unter Modifikationsbedingungen	64
c. Isolierung der α -Untereinheit aus der RNA- Polymerase	64
d. Gewinnung von ^{32}P -markierter modifizierter bzw. alterierter α -Untereinheit	65
e. Isolierung des Alterationsenzym	65
f. In vitro Alteration von E.coli Polymerase	65
g. Carboxymethylierung	66
h. BrCN-Spaltung	66
i. Trypsinspaltung	66
k. Thermolysinspaltung	66
l. Gelchromatographie	66
m. DEAE-Cellulosechromatographie	67
n. Präparativer Fingerprint	67
 D. ZUSAMMENFASSUNG	 68
 E. LITERATURVERZEICHNIS	 70

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Rinonukleinsäure
m-RNA	Messenger-RNA (Boten-RNA)
dAMP	2'-Desoxy-adenosin-5'-monophosphat
dGMP	2'-Desoxy-guanosin-5'-monophosphat
dTMP	2'-Desoxy-thymidin-5'-monophosphat
dCMP	2'-Desoxy-cytidin-5'-monophosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
UMP	Uridin-5'-monophosphat
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
T4-DNA	DNA des Bakteriophagen T4
CT-DNA	Kalbsthymus-DNA
DNase	Desoxyribonuklease
RNase	Ribonuklease
PEP	Phosphoenolpyruvat
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidiert
DTE	Dithioerythrit
moi	Multiplizität der Infektion
cpm	Impulse pro Minute (gemessene)
³² P	Organisch gebundenes ³² P-markiertes Phosphat
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm
UV	Ultraviolett (-es Licht)
	Wellenlänge
	Molarer Extinktionskoeffizient
DEAE-Cellulose	Diäthyl-aminoäthyl-Cellulose
PC	Phosphocellulose

Ala, A	Alanin
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
Cys, C	Cystein
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutaminsäure
Gly, G	Glycin
His, H	Histidin
Ile, I	Isoleucin
Leu, L	Leucin
Lys, K	Lysin
Met, M	Methionin
Phe, F	Phenylalanin
Pro, P	Prolin
Ser, S	Serin
Thr, T	Threonin
Trp, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin
Val, V	Valin
Dansylchlorid	5-N-Dimethylaminonaphthalinsulfon- säurechlorid
DANS-Ala	5-N-Dimethylaminonaphthalinsulfon- säureamid des Alanins
PTH	Phenylthiohydantoin
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-Oxymethyl-aminomethan

A. EINLEITUNG

Die genetische Information liegt in den Zellen in der DNA in einer passiven Form, einer Art Speicher, vor und wird je nach Bedarf abgerufen und dabei in die aktive Form der m-RNA übersetzt. Diese aktive Form enthält nur Bruchteile der gesamten in der DNA gespeicherten Information und veranlaßt die Synthese von Proteinen, den Funktionsträgern des Lebens.

Die genetische Information liegt in der DNA in Form der Sequenz ihrer Bausteine, der Desoxyribonucleotide dAMP, dGMP, dCMP und dTMP, vor. Bei der Übersetzung von Teilen der DNA in m-RNA, der Transkription, wird die Sequenz der Desoxyribonucleotide in die der Bausteine der m-RNA, der Ribonucleotide AMP, GMP, CMP und UMP, umgeschrieben. Die m-RNA dient, an die Ribosomen angeheftet, als Matritze für die Proteinsynthese.

Diese beiden Prozesse der Genexpression, Transkription und Translation (Übersetzung der Ribonucleotidsequenz der m-RNA in die der Aminosäuresequenz der Proteine), werden durch unterschiedliche Enzymsysteme verwirklicht. Die Transkription erfolgt unter der Kontrolle eines Enzyms, der DNA-abhängigen RNA-Polymerase.

Die z.Z. am besten untersuchte Transkriptase, die RNA-Polymerase von E.coli, ist ein sehr großes Molekül mit einem Molekulargewicht von 480000 Daltons (1). Das Enzym setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen: α , β , β' , und σ . Die protomere Form hat die Struktur $\beta\beta'\alpha_2\sigma$ (2,3) und wird als Holoenzym bezeichnet. Bei RNA-Polymeraseaufarbeitungen wird aufgrund des substöchiometrischen Gehalts an σ und der relativ zu den anderen Untereinheiten schwachen Bindung von σ an das Enzym neben dem Holoenzym noch die Core-Form mit der Zusammensetzung $\beta\beta'\alpha_2$ erhalten (1,4,5,6). Die Molekulargewichte der Untereinheiten betragen: β' :160000, β :155000, σ :85000, und α :36500 Daltons(1,4,7,8).

Die Größe und die komplexe Zusammensetzung des Enzyms spiegelt die Vielfalt der bei der Transkription ablaufenden Prozesse wider.

Auf die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA, die das Erkennen von Promotoren voraussetzt, folgt die Initiation und die Elongation der RNA-Kette. Die Termination, die das Erkennen von Terminationssignalen auf der DNA durch die RNA-Polymerase einschließt, beendet die RNA-Synthese.

Ein Verständnis des Ablaufs dieser Prozesse wird durch die Möglichkeit der Zuordnung bestimmter Funktionen zu bestimmten Untereinheiten der RNA-Polymerase erleichtert (s.u. 9). Dabei muß allerdings immer berücksichtigt bleiben, daß die jeweiligen Untereinheiten ihre Funktionen nur im Enzymverband ausüben können. Dies beweist die Tatsache, daß zur Transkription intakter Matritzen das Holoenzym erforderlich ist (10).

Offenbar spielen verschiedene Konformationszustände der Untereinheiten im Verlauf der Transkription eine entscheidende Rolle, und möglicherweise werden diese verschiedenen Konformationszustände erst durch das Zusammenwirken aller Untereinheiten in Verbindung mit den Substraten und dem Produkt RNA ermöglicht.

Der Mechanismus der Transkription wird somit eigentlich erst dann verständlich, wenn man in der Lage ist, die Konformation der Transkriptase zu jedem Zeitpunkt der Transkription vorzusagen. Dazu wird man allerdings erst dann in der Lage sein, wenn man die Primärstruktur des Enzyms kennt, wenn man die verschiedenen aktiven Zentren den entsprechenden Bereichen innerhalb der Aminosäuresequenz zuordnen kann und wenn man zumindest von einem Konformationszustand eine Röntgenstrukturanalyse besitzt, aus der ein dreidimensionales Modell der RNA-Polymerase erhalten werden kann.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag geleistet werden, diese Kenntnisse zu erlangen. Es war geplant,

- 1) einen Beitrag zu leisten zur Erstellung der Aminosäuresequenz der RNA-Polymerase (Teil I der Arbeit),
- 2) einen Beitrag zu leisten zur Zuordnung von Teilfunktionen der Transkription zu bestimmten Sequenzen der entsprechenden Untereinheiten, d.h. zur Lokalisation und Charakterisierung aktiver Zentren (Teil II der Arbeit).

B. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

I. Aminosäuresequenzstudien an der α -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase

1. Einleitung

Die Größe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase von E.coli mit einem Molekulargewicht von 480000 Daltons läßt die Erstellung der Totalsequenz (etwa 4300 Aminosäuren) für ein kleines Team unmöglich erscheinen. Es war daher lediglich geplant, die Aminosäuresequenz einer Untereinheit zu ermitteln, die vom Standpunkt der Sequenzanalyse aus noch recht handlich sein sollte. Dies traf lediglich für die α -Untereinheit zu, die mit einem Molekulargewicht von 36500 Daltons immer noch aus mehr als 300 Aminosäuren besteht. Darüber hinaus bot sich die Sequenzanalyse der α -Untereinheit auch deshalb an, weil α - wie im Abschnitt II noch näher erläutert werden wird - offensichtlich an der Regulation der Genexpression im Verlauf der Infektion von E.coli durch den Bakteriophagen T4 beteiligt ist (11,12,13).

Ähnliche Gründe mögen wohl auch für Ovchinnikov, Lipkin, Modyanov, Chertov und Smirnov gegolten haben, die - wie sich zu einem späteren Zeitpunkt herausstellte - etwa zur gleichen Zeit wie ich begonnen hatten, α zu sequenzieren. Aufgrund der zahlenmäßigen Überlegenheit war es ihnen bereits im Frühjahr 1977 gelungen, die Primärstruktur von α zu veröffentlichen (8).

Eine Fortsetzung der Sequenzanalyse durch mich war damit überflüssig geworden, und so stellen die Resultate in dem Abschnitt I der vorliegenden Arbeit den Stand der Untersuchungen zur Sequenzanalyse von α bis zu dem Zeitpunkt der Publikation von Ovchinnikov et al. dar.

2. Isolierung und Charakterisierung von Bromcyanpeptiden

Methionin ist in der α -Untereinheit der RNA-Polymerase fünf mal enthalten (8,14), wobei eines N-terminal ist (8,14). Die Spaltung mit BrCN (15,16) liefert demnach fünf Peptide, deren Isolierung, Charakterisierung und Zuordnung zueinander in den nächsten Abschnitten beschrieben werden soll.

2.1. Isolierung der Bromcyanpeptide

Durch Spaltung von carboxymethyliertem α mit BrCN werden nach Chromatographie über Sephadex G 50 vier Fraktionen erhalten, von denen die Fraktionen CB IV und CB III homogen bezüglich ihrer Peptidzusammensetzung sind (Abb. 1).

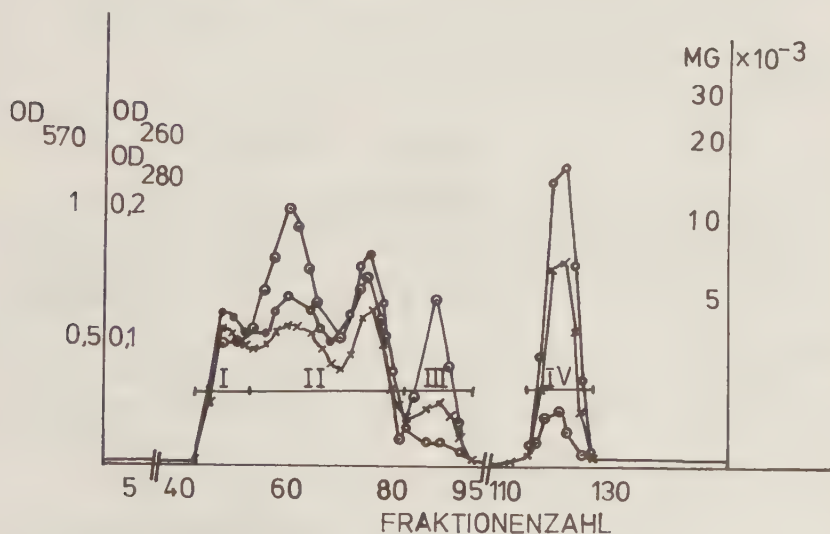


Abb. 1: Chromatographie von mit BrCN gespaltenem carboxymethyliertem α über Sephadex G 50

40 mg mit BrCN gespaltenes α wurde auf eine Sephadex G 50 Säule (150x2 cm) aufgetragen. Elutionsmittel 10 %ige Essigsäure, Fraktionsgrößeß 1,5 ml. o—o:OD₂₈₀, x—x:OD₂₆₀, —o—o:OD₅₇₀

des mit Ninhydrin gefärbten Hydrolysats von 50 μ l je Fraktion, ---:Molekulargewicht.

Die Fraktion CB II enthält neben einem geringen Anteil an Überlappungspeptiden hauptsächlich ein Gemisch von drei Peptiden, deren Trennung mit Hilfe der Chromatographie an DEAE-Cellulose gelingt (Abb. 2).

Sowohl die Durchlaufraction CB II-1 als auch die Fraktion CB II-3 stellen homogene Peptidfraktionen dar. Die Fraktion CB II-3 tritt als Doppelpeak auf, eine Erscheinung, die auch bei der Elektrophorese von Bromcyanpeptiden auffällt und deren Ursache - siehe auch 2.2. - in dem Auftreten eines Bromcyanpeptids in der Homoserin- und der Homoserinlaktoneform zu erklären ist (16). Die Fraktion CB II-1 erscheint nicht als Doppelpeak, da sowohl für die Homoserin- als auch für die Laktoneform dieses Peptids die Ionenstärke der äquilibrierten Säule zu groß ist, als daß das Peptid durch die DEAE-Cellulose gebunden werden könnte.

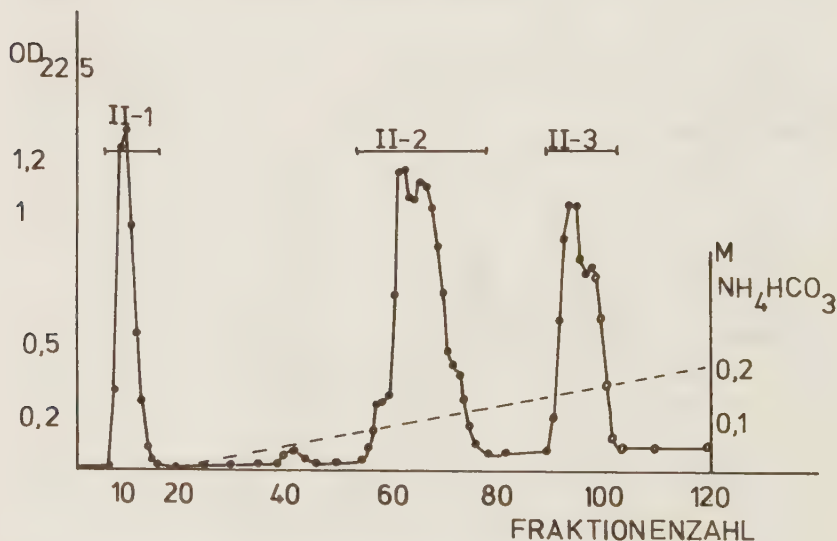


Abb. 2: Chromatographie von CB II über DEAE-Cellulose

Die Fraktion CB II wurde über eine DEAE-Cellulosesäule (1,1x10 cm) aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten (2x 50 ml:10 - 200 mM Ammoniumhydrogencarbonat), Fraktionsgröße: 1ml. o—o:OD₂₂₅, ---:NH₄HCO₃-Konzentration im Elutionspuffer

Die Fraktion CB II-2 wurde durch erneute Chromatographie über DEAE-Cellulose mit einem erheblich flacheren Gradienten aufgetrennt (Abb. 3). Auf diese Weise wurden die Überlappungs-peptide so weit von der Fraktion CB II-2b abgetrennt, daß diese sich in der Elektrophorese als homogen erwies.

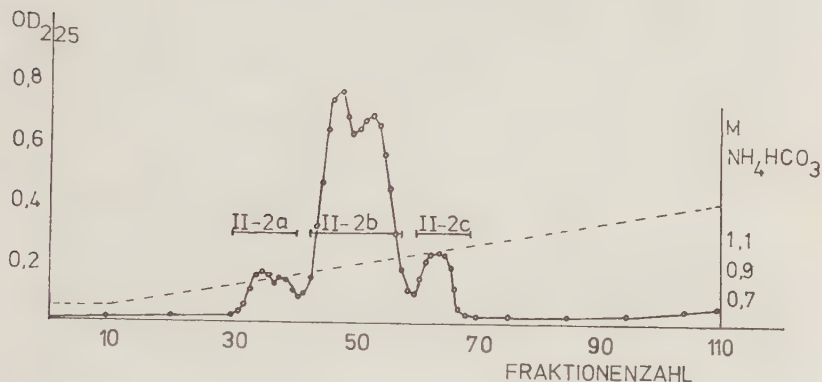


Abb. 3: Chromatographie von CB II-2 über DEAE-Cellulose

Fraktion CB II-2 wurde über eine DEAE-Cellulosesäule (1,1x7 cm) aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten (2x50 ml: 60 - 130 mM Ammoniumhydrogencarbonat), Fraktionsgröße: 1ml. o—o: OD₂₂₅, ---: NH₄HCO₃-Konzentration

Die Fraktion CB I enthielt fast ausschließlich Überlappungs-peptide und wurde daher nicht zur Isolierung der BrCN-Peptide herangezogen.

2.2. Charakterisierung der Bromcyanpeptide

Die Fraktion CB IV wurde durch dünnschichtchromatographische Analyse auf Homogenität untersucht (Abb. 4).

Abb. 4: Dünnschichtchromatographische Analyse von CB IV

CB IV wurde gegen ein Aminosäuregemisch (die beiden äußeren Reihen von unter nach oben: Arg, Gly, Ala, Leu) als Referenz auf Kieselgel dünn-schichtchromatographisch analysiert



Die Anreicherung der Peptide CB III, CB II-1, CB II-2b und CB II-3 wurde sowohl mittels SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese als auch mit Hilfe der Elektrophorese auf Celluloseacetatstreifen überprüft. Der Grund für die doppelte Kontrolle liegt

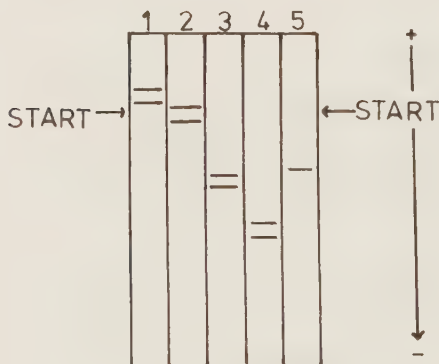


Abb. 5: Auftrennung der BrCN-Peptide durch Cellogelelektrophorese

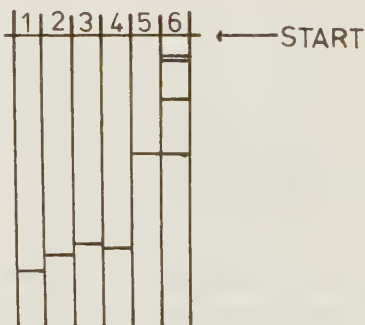


Abb. 6: Auftrennung der BrCN-Peptide durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Die BrCN-Peptide wurden durch Cellogel- (Abb. 5) bzw. SDS-Polyacrylamidelektrophorese (Abb. 6) analysiert. Bahn 1: CB III, Bahn 2: CB II-1, Bahn 3: CB II-2b, Bahn 4: CB II-3, Bahn 5: α Bahn 6 (Abb. 6): Holoenzym

einmal in den geringen Molekulargewichtsunterschieden der Bromcyanpeptide, zum anderen in dem Auftreten von Doppelbanden bei der Cellogelelektrophorese, so daß zumindest im Fall der Fraktionen CB III und CB II-1 nur durch Kombination beider Elektrophoreseverfahren exakt auf die Reinheit der Peptide geschlossen werden konnte (Abb. 5 und 6).

Daß es sich bei den Doppelbanden in der Cellogelelektrophorese tatsächlich um jeweils identische Peptide handelt, konnte durch Ausschneiden der einzelnen Banden mit anschließender Analyse jeweils beider Peptide bewiesen werden. Jede Einzelbande einer solchen Doppelbande zeigte identische Aminosäurezusammensetzungen, identische Endgruppen sowie identische Beweglichkeit in der SDS-Polyacrylamidelektrophorese.

Die einzig wahrscheinliche Interpretation dieser Resultate ist die unter 2.1. bereits erwähnte Tatsache, daß BrCN-Peptide sowohl in der Homoserin- als auch in der Laktonform vorliegen (16), und daß diese Formen während der Elektrophorese nebeneinander so stabil sind, daß nach einer Cellogelelektrophorese, die hauptsächlich nach Ladung auftrennt, ein homogenes BrCN-Peptid zwei Banden ergibt.

In der Tabelle 1 sind die Aminosäurezusammensetzungen der Bromcyanpeptide sowie ihre N-terminale Aminosäuren aufgeführt. Daneben wird die aus allen BrCN-Peptiden aufsummierte Anzahl der einzelnen Aminosäuren mit der unter (14) publizierten Aminosäurezusammensetzung verglichen. Dabei fällt auf, daß nach den Resultaten der vorliegenden Arbeit α 32 Aminosäuren weniger enthält als unter (14) publiziert worden ist (vergl. aber 8 und Abb. 14).

2.3. Sequenzanalysen

Eine Totalsequenz wurde lediglich von dem Peptid CB IV ermittelt, da - wie unter 1. erwähnt - Ovchinnikov et al. (8)

Aminosäure	CB II-1	CB II-2b	CB II-3	CB III	CB IV	aller BrCN-Pep- tide	(14)
Tryptophan	-	-	-	-	0,36	1	3
Lysin	2,01	7,05	4,98	1,93	-	16	17
Histidin	1,21	1,86	3,04	2,99	-	9	8
Arginin	9,17	8,11	1,01	3,90	0,98	23	24
Homoserin	0,98	0,92	1,05	1,02	-	4	(4)
Cysteinsäure	0,70	0,75	1,61	-	-	4	4
Asparagin- säure	5,16	11,07	11,04	2,17	1,98	31	33
Methionin- sulfon	-	-	-	0,82	-	1	5 (1)
Threonin	1,88	6,70	5,98	3,66	-	19	20
Serin	2,76	3,94	3,75	4,70	1,06	17	21
Glutaminsäure	8,02	17,24	13,11	6,06	2,02	46	51
Prolin	3,04	6,17	2,98	1,93	2,04	16	17
Glycin	2,94	5,30	8,91	4,86	-	26	27
Alanin	4,82	8,91	3,96	1,94	1,83	22	26
Valin	6,57	7,62	9,79	3,68	-	31	34
Isoleucin	5,61	6,68	8,74	1,73	0,90	25	23
Leucin	3,70	15,45	9,76	7,76	0,92	37	39
Tyrosin	2,63	0,87	1,05	-	-	5	6
Phenylalanin	-	1,75	-	1,82	-	4	6
Gesamt	62	112	92	53	13	332	364
N-Terminus	Arg	Glx	Pro	Met	Arg		

Tab. 1: Aminosäurezusammensetzungen der Bromcyanpeptide von α und ihre N-Termini

CB II-1 :Arg-Ile-Lys-Val-Gln-Arg-

CB II-2b:Glu-Thr-Asx-Gly-Thr-

CB II-3 :Pro-Gly-Cys-

CB III :Met-Gln-Gly-Ser-Val-Thr-

CB IV :Arg-Leu-Glu-Asn-Trp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Asp-Glu

Tab. 2: N-terminale Sequenzen der Bromcyanpeptide von α

die Primärstruktur von α publizierten, bevor ich die Sequenzen der anderen BrCN-Peptide ermitteln konnte. Von den Peptiden CB III, CB II-1, CB II-2b, CB II-3 waren zu diesem Zeitpunkt lediglich die N-terminalen Bereiche nach dem manuellen Edman-Abbau ermittelt worden, um ihre Zuordnung zueinander zu ermöglichen (vergl. Abschnitt 3. und 4.). Dies erklärt die Unvollständigkeit der in der Tabelle 2 zusammengefaßten N-terminalen Sequenzen der Bromcyanpeptide.

3. Zuordnung der Bromcyanpeptide zueinander

3.1. Einleitung

Die Zuordnung der BrCN-Peptide zueinander war dadurch erleichtert worden, daß zwei der fünf Peptide von vorneherein eindeutig als N- bzw. C-terminale Peptide erkannt werden konnten (vergl. Abb. 12).

Das Peptid CB III hat als N-terminale Aminosäure Methionin. Da durch die BrCN-Spaltung Methionin in Homoserin umgewandelt wird (16), und diese Reaktion bei einem N-terminalen Methionin häufig ausbleibt (17), lag die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um das N-terminale Peptid handelt. Der eindeutige Beweis der Lage von CB III ist die Identität dessen N-terminaler Sequenz mit der von α (8 aber auch 14).

Das Peptid CB IV enthält als einziges BrCN-Peptid kein Homoserin. Damit ist auch für dieses Peptid die Lage eindeutig festgelegt, da lediglich in einem C-terminalen BrCN-Peptid Homoserin bzw. Homoserinlaktone fehlen kann.

Die Zuordnung der drei übrigen BrCN-Peptide zueinander erfolgte mit Hilfe methioninhaltiger tryptischer Peptide. Zu diesem Zweck wurde α tryptisch gespalten, zwei methioninhaltige tryptische Peptide isoliert und deren N-terminale Sequenz bestimmt. Die Zuordnung des C-terminalen Bereichs

dieser tryptischer Peptide war durch die ermittelten N-terminalen Sequenzen der tryptischen Peptide möglich, die jeweils zwei Aminosäuren über das Methionin hinaus identifizieren ließen und damit den N-terminalen Bereich zweier BrCN-Peptide enthielten (vergl. Abb. 12). Durch tryptischen Verdau der Bromcyanpeptide bzw. BrCN-Spaltung der tryptischen Peptide und Auffinden und Zuordnen der überlappenden Bereiche von Bromcyan- und tryptischen Peptiden war schließlich eine eindeutige Aneinanderreihung der Bromcyanpeptide möglich (vergl. Abb. 12).

3.2.1. Tryptischer Verdau von α

Der vollständige tryptische Verdau von α sollte 40 Peptide ergeben, da α 23 Arginine und 16 Lysine enthält (8,14).

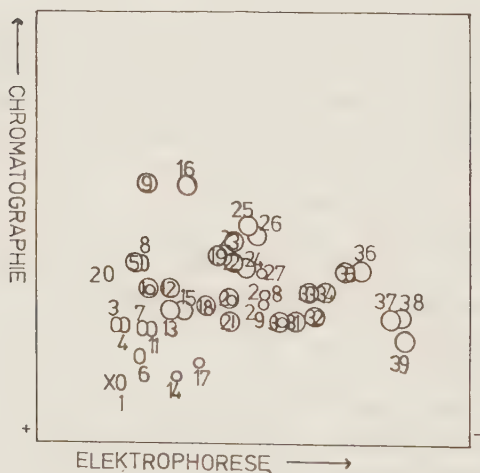


Abb. 7: Tryptischer Fingerprint von α

Aufgrund der unvollständigen Spaltung von Lys-Asp, Lys-Val, Lys-Leu und Lys-Lys - Bindungen bzw. der völligen Resistenz der Lys-Pro und Arg-Pro - Bindungen (8) verringert sich die Anzahl der theoretisch zu erwartenden Peptide. Der Finger-print von α läßt 39 Flecke erkennen. Diese recht große Anzahl hat ihre Ursache wahrscheinlich darin, daß infolge schwer-spaltbarer Bindungen mehr Peptide erhalten werden, als theoretisch zu erwarten ist. Es wird also z.T. nebeneinander das kleinstmögliche und das damit überlappende tryptische Peptid vorliegen. Diese Vermutung ließ sich bei den Flecken 5 und 8 bestätigen (vergl. Abschnitt 3.2.3.).

Die Isolierung der methioninhaltigen Peptide aus einer derartigen Vielzahl von Peptiden war ohne Fraktionierung des tryptischen Verdaues unmöglich. Es wurde daher über Sephadex G 25 eine Vorfraktionierung durchgeführt (Abb. 8) und die einzelnen Fraktionen auf ihren Methioningehalt hin untersucht,

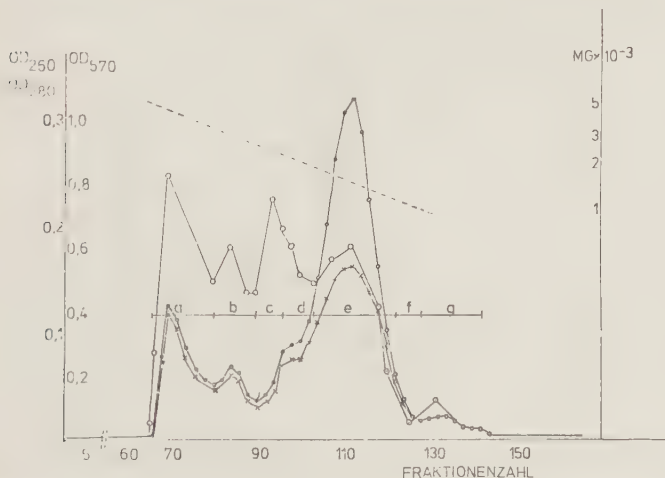


Abb. 8: Chromatographie eines tryptischen Verdaues von α über Sephadex G 25

40 mg tryptisch verdautes carboxymethyliertes α wurde auf eine Sephadex G 25 Säule (150x2 cm) aufgetragen. Elutionsmittel: 10 %ige Essigsäure, Fraktionsgröße: 1,5 ml. o—o: OD₂₈₀, x—x: OD₂₆₀, ●—●: OD₅₇₀ des mit Ninhydrin gefärbten Hydrolysates von 50 μ l je Fraktion, ---: Molekulargewicht

indem ein Aliquot einer jeden Fraktion einer Aminosäureanalyse unterzogen wurde. Dabei zeigten die Fraktionen a bis e einen signifikanten Methioningehalt, während die Fraktionen f und g frei von Methionin waren. Die methioninhaltigen Fraktionen wurden im Fingerprint analysiert (Abb. 9).

Aufgrund der geringen Anzahl an Peptiden in den Fraktionen a und b war zu erwarten, daß das Auffinden und Isolieren der methioninhaltigen Peptide aus diesen Fraktionen erheblich einfacher sein würde als aus den Fraktionen c, d und e. Deshalb wurden diese Fraktionen für die Isolierung der methioninhaltigen Peptide benutzt. Die Fraktion e enthielt als einzige tryptophanhaltige Peptide, wie sich durch die Fluoreszenz dieser Flecken zeigte. Aus Untersuchungen der aus α gewonnenen BrCN-Peptide war bekannt, daß lediglich in dem C-terminalen Bereich von α Tryptophan enthalten ist (vergl. 2.3.);

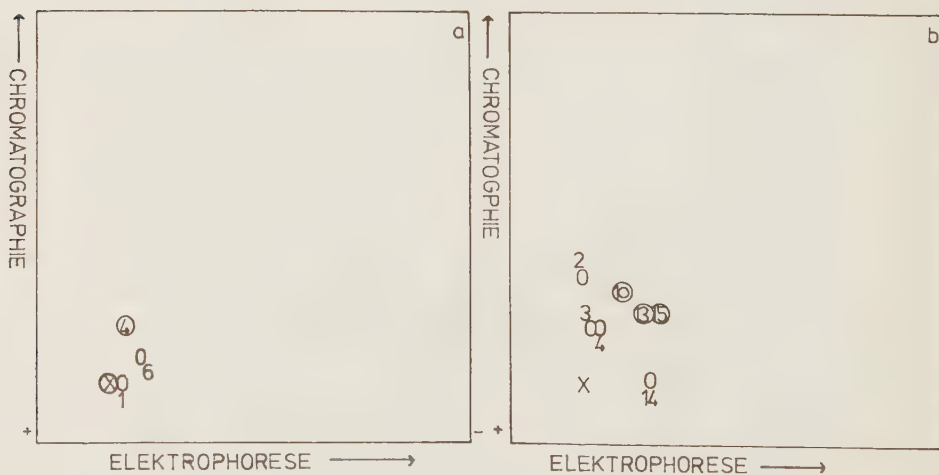


Abb. 9: Fingerprints der Fraktionen α -T-a und α -T-b

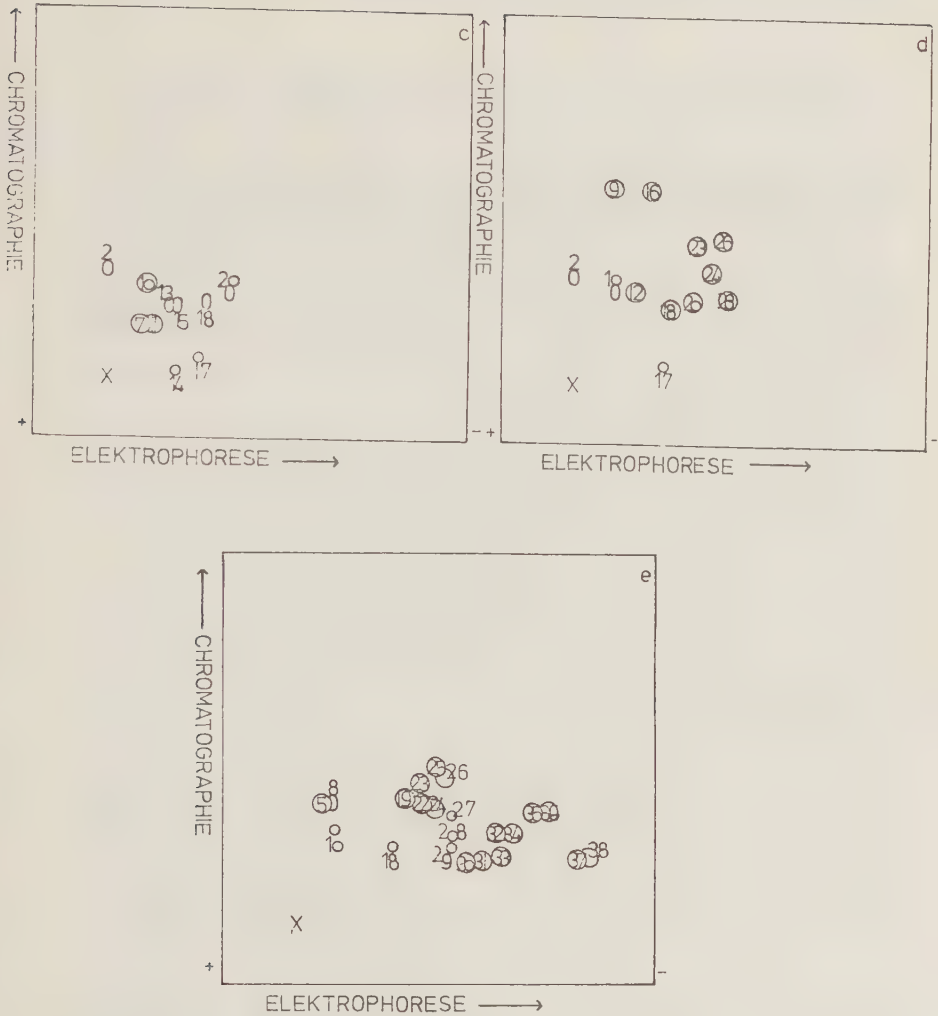


Abb. 9: Fingerprints der Fraktionen α -T-c bis α -T-e

daher sollten aus dieser Fraktion die tryptophanhaltigen Peptide Te-5 und Te-8 zur Überprüfung der C-terminalen Sequenz herangezogen werden.

3.2.2. Isolierung methioninhaltiger tryptischer Peptide

Um die methioninhaltigen Peptide zu erkennen, wurde jeder einzelne durch Anfärbung mit Fluorescamin bzw. Ninhydrin erhaltene Fleck eines Fingerprints ausgekratzt (18) und mittels Aminosäureanalyse auf seinen Methioningehalt hin untersucht. Aus den Fraktionen a und b enthielten lediglich die Peptide a-6 und b-3 in signifikanten Mengen Methionin. Von den beiden tryptophanpositiven Flecken 5 und 8 der Fraktion e enthielt der Fleck 8 ebenfalls Methionin.

Die weitere Reinigung der Peptide erfolgte nun analog zu einem Fingerprint. In erster Dimension wurden die Fraktionen durch Elektrophorese unter Ausnutzung der ganzen Fläche einer Dünnschichtplatte aufgetrennt. Die dem gesuchten Peptid entsprechende Bande wurde ausgekratzt und vom Trägermaterial eluiert. Anschließend wurde das Peptidgemisch einer Bande durch Dünnschichtchromatographie weiter aufgetrennt, so daß die Peptide in ausreichend sauberer Form vorlagen (vergl. Material und Methoden).

Diese Methode ermöglicht eine Schärfe der Auftrennung von Peptiden, die der eines Fingerprints entspricht - bei Verwendung von Ausgangsmengen bei α bis zu 300 nM pro Dünnschichtplatte. Das sind Mengen, die in einer zweidimensionalen Analyse auf einer einzigen Platte bei weitem nicht mehr bewältigt werden können. Der Zeitaufwand dabei ist nur unwesentlich größer als für einen analytischen Fingerprint.

Auf diese Weise wurden vier Peptide isoliert, von denen drei Methionin enthielten; zwei Peptide enthielten Tryptophan. Die tryptophanhaltigen Peptide wurden, wie bereits erwähnt, le-

diglich zur Überprüfung der C-terminalen Sequenz von α untersucht, da bereits zwei methioninhaltige tryptische Peptide eine eindeutige Zuordnung der Bromcyanpeptide ermöglicht (vergl. 3.1.).

3.2.3. Charakterisierung der Peptide Ta-6, Tb-3, Te-5 und Te-8

Die Peptide Ta-6, Tb-3, Te-5 und Te-8 wurden durch Aminosäureanalyse und Endgruppenbestimmung auf ihre Reinheit hin untersucht und charakterisiert (Tab. 3).

Die N-terminalen Sequenzen der Peptide Ta-6 und Tb-3 wurden durch manuellen Edman-Abbau (15,19,20,21,22) bestimmt (Tab. 4).

Aminosäure	Ta-6	Tb-3	Te-5	Te-8
Tryptophan	-	-	0,2-	0,20
Leucin	1,26	-	-	-
Histidin	1,13	-	-	-
Arginin	-	2,01	-	1,12
Glutaminsäure	0,82	-	-	-
Asparaginsäure	0,99	1,94	1,33	1,99
Methioninsulfon	0,79	0,82	-	0,71
Threonin	1,79	1,81	-	-
Serin	2,90	-	0,83	1,85
Glutaminsäure	1,04	1,29	1,32	2,03
Prolin	1,00	0,97	2,05	1,96
Glycin	2,11	1,07	-	2,15
Alanin	0,92	0,99	2,10	2,04
Valin	2,76	-	-	-
Isoleucin	1,77	2,81	0,21	0,83
Leucin	2,89	0,86	1,00	2,90
Tyrosin	0,90	-	-	-
Gesamt	26	19	12	19
N-Terminus	Ile	Leu	Leu	Gly

Tab. 3: Aminosäurezusammensetzung der Peptide Ta-6, Tb-3
Te-5 und Te-8 und ihre N-Termini

Ta-6 : Ile-Leu-Leu-Ser-Ser-Met-Pro-Gly-

Tb-3 : Leu-Val-Ile-Glu-Met-Glu-Thr-

Tab. 4: N-terminale Sequenzen der Peptide Ta-6 und Tb-3

3.3. Zuordnung der tryptischen Peptide zu Bromcyanpeptiden

3.3.1. Einleitung

Die unter 3.2. beschriebenen Peptide Ta-6 und Tb-3 enthalten jeweils einen N- und einen C-terminalen Bereich, der identisch ist mit den C- bzw. N-terminalen Sequenzen der sie überlappenden Bromcyanpeptide. Zur Identifizierung dieser überlappenden Bereiche wurden zunächst die beiden tryptischen Peptide mit BrCN nachgespalten und deren N-terminale Bereiche im Fingerprint lokalisiert. Dann wurden die Bromcyanpeptide tryptisch verdaut und im Fingerprint auf die C-terminalen Peptide hin untersucht, die den N-terminalen Bromcyanpeptiden der tryptischen Peptide entsprachen.

Die N-terminalen Sequenzen von Ta-6 bzw. Tb-3 enthielten bereits die N-terminalen Bereiche zweier Bromcyanpeptide. Durch Vergleich der Tabellen 2 und 4 konnten diese BrCN-Peptide zweifelsfrei als CB II-2b bzw. CB II-3 identifiziert werden.

3.3.2. Nachspaltung der Peptide Ta-6 und Tb-3 mit BrCN

Die Peptide Ta-6 und Tb-3 wurden nach Spaltung mit BrCN im Fingerprint analysiert (Abb. 10).

Die Abb. 10 zeigt, daß sich bei den Hydrolysaten beider Peptide

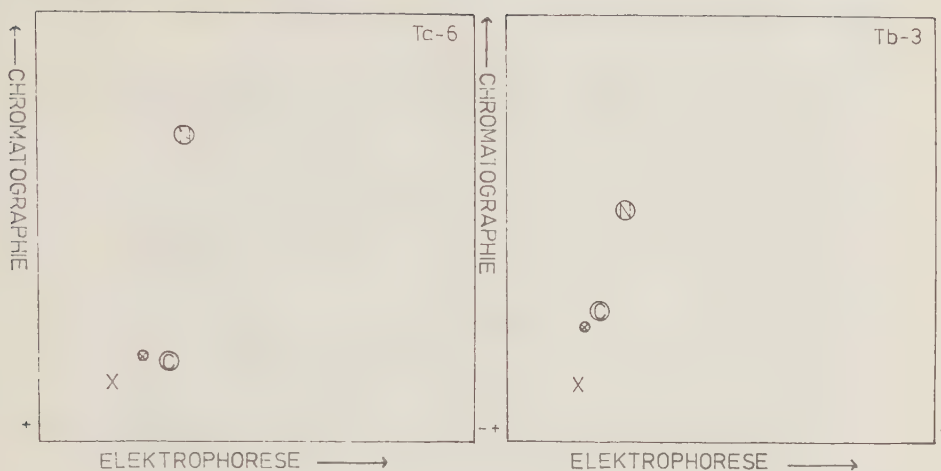


Abb. 10: Fingerprints der mit BrCN gespaltenen Peptide Ta-6 und Tb-3

die Fragmente N (N-terminale Peptide) durch Dünnschichtchromatographie leicht würden abtrennen lassen. Die Peptide C (C-terminale Peptide) sollten sich dagegen durch Elektrophorese nach bereits erfolgter Abtrennung der N-terminalen Peptide isolieren lassen.

Auf diese Weise erfolgte auch die Isolierung der mit BrCN gespaltenen tryptischen Peptide, deren Aminosäurezusammensetzungen und N-Termini in der Tabelle 5 zusammengefaßt sind.

Die in der Tabelle 4 aufgeführten Sequenzen und die Aminosäureanalysen von Ta-6 bzw. Tb-3 (Tab. 3) stimmen mit den Werten in der Tabelle 5 überein.

Die Peptide Ta-6-CB-X und Tb-3-CB-X entsprachen der Aminosäurezusammensetzung nach den ungespaltenen Peptiden. Der Anteil an ungespaltenem Material war gering.

Aminosäure	Ta-6-N	Ta-6-C	Tb-3-N	TTb-3-C	Die Aminosäurezusammensetzung von Ta-6-CB X ist identisch mit der von Tb-3	Die Aminosäurezusammensetzung von Tb-3-CB X ist identisch mit der von Ta-6
Lysin	-	1,00	-	-		
Histidin	-	1,15	-	-		
Arginin	-	-	-	1,99		
Homoserin	1,05	-	1,02	-		
Cysteinsäure	-	0,72	-	-		
Asparagin-säure	-	0,98	-	2,01		
Threonin	-	1,75	-	1,88		
Serin	1,93	0,89	-	-		
Glutaminsäure	-	3,15	1,05	2,99		
Prolin	-	1,01	-	0,95		
Glycin	-	2,11	-	1,02		
Alanin	-	0,89	-	0,99		
Valin	-	2,69	0,92	-		
Isoleucin	0,89	0,93	0,93	1,88		
Leucin	1,90	0,88	0,90	-		
Tyrosin	-	0,90	-	-		
Gesamt	6	20	5	14		
N-Terminus	Ile	Pro	Leu	Glx		

Tab. 5: Aminosäurezusammensetzung der nach BrCN-Spaltung von Ta-6 und Tb-3 erhaltenen Peptide

3.3.3. Zuordnung von Ta-6 und Tb-3 zu tryptischen Fragmenten aus Bromcyanpeptiden

Die Bromcyanpeptide CB III, CB II-1, CB II-2b und CB II-3 wurden tryptisch verdaut und im Fingerprint analysiert (Abb. 11). Die Spaltung von CB IV hatte sich erübrigt, da es sich hierbei um das C-terminale Bromcyanpeptid handelt mit einem N-terminalen Arginin als einzige basische Aminosäure. Da weder bei

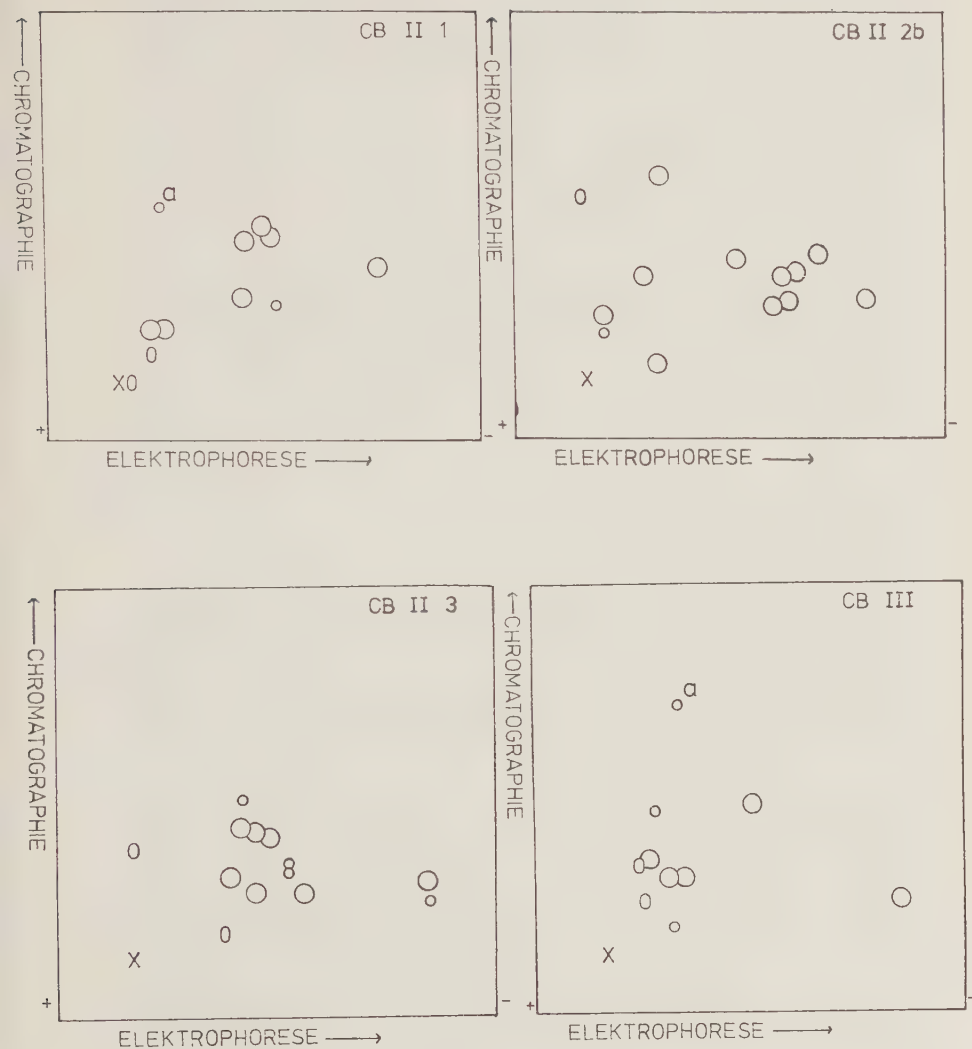


Abb. 11: Fingerprints der mit Trypsin gespaltenen Bromcyan-
peptide CB III, CB II-1, CB II-2b und CB II-3

Ta-6 noch bei Tb-3 nach Spaltung mit BrCN freies Arginin entsteht, kann es sich in beiden Fällen nicht um die Überlappungspeptide handeln, die das C-terminale Bromcyanpeptid CB IV erfassen.

Zum Auffinden der mit den Peptiden Ta-6-CB-N bzw. Tb-3-CB-N identischen tryptischen Bromcyanpeptide, wurde der tryptische Verdau eines jeden Bromcyanpeptids zusammen mit jeweils Ta-6-CB-N bzw. Tb-3-CB-N im Fingerprint analysiert. Die Kombinationen von dem tryptischen Verdau von CB III mit Ta-6-CB-N und CB II-1 mit Tb-3-CB-N waren identisch mit denen der tryptischen Spaltprodukte der entsprechenden reinen Bromcyanpeptide. Alle übrigen Kombinationen zeigten im Fingerprint den zusätzlichen Fleck zu denen der tryptischen Spaltprodukte der Bromcyanpeptide, der dem Peptid Ta-6-CB-N bzw. Tb-3-CB-N entsprach.

Damit war die Identität der Peptide Ta-6-CB-N mit CB III-a und Tb-3-CB-N mit CB II-1-a bewiesen.

Die N-terminale Sequenz von CB II-3 mit Pro-Gly-Cys- läßt - durch Vergleich mit der Sequenz -Met-Pro-Gly- innerhalb von Ta-6 (vergl. Tab. 2 und 4) - zweifelsfrei erkennen, daß dieses Bromcyanpeptid auf CB III folgt, dessen C-terminales tryptisches Peptid identisch ist mit Ta-6-CB-N. Die N-terminale Sequenz von CB III charakterisiert dieses Peptid eindeutig als das N-terminale Bromcyanpeptid von α (8,14).

CB IV ist aufgrund des Fehlens von Homoserin eindeutig als C-terminales Bromcyanpeptid von α zu erkennen.

Da Tb-3 die Sequenz -Met-Glu-Thr- enthält, in der die N-terminale Sequenz von CB II-2b (Glu-Thr-Asx...) enthalten ist, und Tb-3-CB-N identisch ist mit CB II-1-a, folgt, daß CB II-2b auf CB II-1 folgt. Damit folgt gleichzeitig die komplette Reihenfolge aller Bromcyanpeptide: CB III $\longrightarrow$ CB II-3 $\longrightarrow$ CB II-1 $\longrightarrow$ CB II-2b $\longrightarrow$ CB IV. In der Abb. 12 sind diese Ergebnisse schematisch zusammengefaßt.

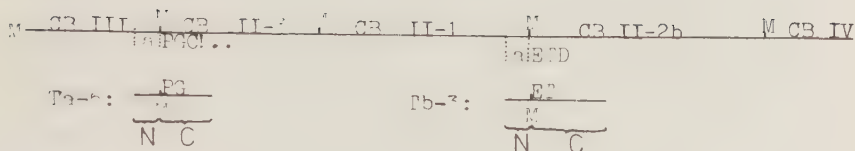


Abb. 12: Überlappende Bereiche von Ta-6 bzw. Tb-3 mit den Bromcyanpeptiden

4. Zusammenfassung und Diskussion

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war geplant, in Zusammenarbeit mit H. Fujiki die Totalsequenz der α -Untereinheit der RNA-Polymerase zu erstellen. Zu diesem Zweck sollten die Bromcyanpeptide durch den automatischen Edman-Abbau (23,24,25) so weit wie möglich sequenziert werden. Die auf diese Weise nicht erreichten C-terminalen Sequenzen sollten durch manuellen Edman-Abbau von Peptiden, die durch enzymatischen Verdau (Trypsin, Clostripain, Chymotrypsin) erhalten werden sollten, ermittelt werden. Desgleichen sollte durch tryptische, die Bromcyanpeptide überlappende Peptide, die Aneinanderreihung der Bromcyanpeptide ermöglicht werden.

Die Veröffentlichung der Totalsequenz von α durch Ovchinnikov et al. (8) im Frühjahr 1977 machte eine Fortsetzung der geplanten Arbeit überflüssig. Durch die bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Resultate war allerdings eine teilweise Überprüfung der publizierten Sequenzen möglich.

Die Abb. 13 faßt die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate zur Sequenzanalyse der α -Untereinheit der RNA-Poly-

methioninhaltigen Peptiden, die jeweils den C-terminalen Bereich des N-terminalständigen und den N-terminalen Bereich des C-terminalständigen Bromcyanpeptides enthielten. Die N-terminalen Bereiche dieser tryptischen Peptide wurden ermittelt. Die Sequenzen im vierten Bromcyanpeptid (CB II-2b) wurden im Verlauf der Untersuchungen zum Auffinden des Ortes der ADP-Ribosylierung von α durch den Phagen T4 erhalten (vergl. Teil II).

Der direkte Vergleich der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse mit der von Ovchinnikov et al. (8) publizierten Totalsequenz von α (Abb. 14) zeigt nur sehr geringe Unterschiede in den Bereichen, in denen lediglich die Aminosäurezusammensetzungen durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Sequenzen von Ovchinnikov et al. verglichen werden. Da die Genauigkeit der Aminosäureanalyse der Sequenzanalyse grundsätzlich unterlegen ist, wäre es durchaus denkbar, daß nach Ermittlung der Primärstruktur dieser Bereiche die ermittelten Aminosäurezusammensetzungen einer entsprechenden Korrektur bedürfen.

Eine exakte Überprüfung von Primärstrukturen ist nur durch Vergleich von Aminosäuresequenzen möglich. Die Überprüfung der von Ovchinnikov et al. ermittelten Primärstruktur von α ist daher nur teilweise möglich. In den Bereichen, in denen Sequenzen direkt miteinander verglichen werden können, liegt totale Übereinstimmung der Resultate vor, und damit kann die Sequenz von α zumindest in diesen Bereichen als gesichert gelten.

Ov: Met-Gln-Gly-Ser-Val-Thr-Glu-Phe-Leu-Lys-Ile-Arg-Leu-Val-Asp-Ile- E: Met-Gln-Gly-Ser-Val-Thr-(Ala ₁ , Arg ₄ , Asx ₂ , Glx ₁ , Gly ₅ , His ₃ , Leu ₆ , Lys ₂)-	16
Ov: Glu-Gln-Val-Ser-Ser-Thr-His-Ala-Lys-Val-Thr-Leu-Glu-Pro-Leu-Glu- E: Ile ₁ , Phe ₂ , Pro ₂ , Ser ₂ , Thr ₃ , Val ₃)-	32
Ov: Arg-Gly-Phe-Gly-His-Thr-Leu-Gly-Asn-Ala-Leu-Arg-Arg-Ile-Leu-Leu- E: Ile-Leu-Leu-	43
Ov: Ser-Ser-Met-Pro-Gly-Cys-Ala-Val-Thr-Glu-Val-Glu-Ile-Asp-Ile-Val- E: Ser-Ser-Met-Pro-Gly-Cys-(Ala ₁ , Asx ₁ , Glx ₂ , Glu ₁ , His ₁ , Leu ₁ , Lys ₁ , Ile ₁)-	64
Ov: Leu-His-Glu-Tyr-Ser-Thr-Lys-Glu-Gly-Val-Gln-Glu-Arg-Ile-Leu-Glu- E: Ser ₁ , Thr ₂ , Tyr ₁ , Val ₃)-(Ala ₄ , Arg ₁ , Asx ₁₀ , Cys ₁ , Glx ₁₀ , Gly ₇ , His ₂)-	80
Ov: Ile-Leu-Leu-Asn-Leu-Lys-Gly-Leu-Ala-Val-Ile-Val-Gln-Gly-Lys-Asp- E: Leu ₃ , Lys ₄ , Ile ₃ , Pro ₂ , Ser ₃ , Thr ₄ , Val ₇)-	96
Ov: Glu-Val-Ile-Leu-Thr-Leu-Asn-Lys-Ser-Gly-Ile-Gly-Pro-Val-Thr-Ala-	112
Ov: Ala-Asp-Ile-Thr-His-Asp-Gly-Asp-Val-Glu-Ile-Val-Lys-Pro-Gln-His-	128
Ov: Val-Ile-Cys-His-Leu-Thr-Asp-Glu-Asn-Ala-Ser-Ile-Ser-Met-Arg-Ile- E: Met-Arg-Ile-	144
Ov: Lys-Val-Gln-Arg-Gly-Arg-Gly-Tyr-Val-Pro-Ala-Ser-Thr-Arg-Ile-His- E: Lys-Val-Gln-Arg-(Ala ₄ , Arg ₇ , Asx ₅ , Cys ₁ , Glx ₆ , Gly ₂ , His ₁ , Leu ₃ , Lys ₁)-	160
Ov: Ser-Glu-Glu-Asp-Glu-Arg-Pro-Ile-Gly-Arg-Leu-Leu-Val-Asp-Ala-Cys- E: Ile ₄ , Pro ₃ , Ser ₃ , Thr ₂ , Tyr ₃ , Val ₃)-	176
Ov: Tyr-Ser-Pro-Val-Glu-Arg-Ile-Ala-Tyr-Asn-Val-Glu-Ala-Ala-Arg-Val-	192
Ov: Glu-Gln-Arg-Thr-Asp-Leu-Asp-Lys-Leu-Val-Ile-Glu-Met-Glu-Thr-Asn- E: Leu-Val-Ile-Glu-Met-Glu-Thr-Asn-	208
Ov: Gly-Thr-Ile-Asp-Pro-Glu-Glu-Ala-Ile-Arg-Arg-Ala-Ala-Thr-Ile-Leu- E: Gly-Thr-(Ala ₁ , Arg ₂ , Asx ₁ , Glx ₂ , Gly ₁ , Ile ₂ , Pro ₁)-(Ala ₇ , Arg ₄ , Glx ₁₀)-	224
Ov: Ala-Glu-Gln-Leu-Glu-Ala-Phe-Val-Asp-Leu-Arg-Asp-Val-Arg-Gln-Pro- E: Asx ₅ , Gly ₂ , His ₂ , Leu ₃ , Lys ₅ , Ile ₄ , Phe ₁ , Pro ₃ , Ser ₃ , Thr ₃ , Tyr ₁ , Val ₆ -	240
Ov: Glu-Val-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro-Glu-Phe-Asp-Pro-Ile-Leu-Leu-Arg-Pro- E: Glu-Glu-Lys-Pro-Glu-Phe-Asp-Ile-Ile-Leu-Leu-Arg-Pro-	256
Ov: Val-Asp-Asp-Leu-Glu-Leu-Thr-Val-Arg-Ser-Ala-Ala-Gln-Leu-Ile-Ala- E: Val-Asx-Asx-Leu-(Glx ₁ , Leu ₁ , Thr ₁ , Val ₁)-Arg-Ser-(Ala ₁ , Asx ₁ , Cys ₁)-Leu-Lys-	272
Ov: Glu-Ala-Ile-His-Tyr-Ile-Gly-Arg-Leu-Val-Glu-Arg-Thr-Glu-Val-Ile-	288
Ov: Leu-Leu-Lys-Thr-Pro-Asn-Leu-Gly-Lys-Lys-Ser-Leu-Thr-Glu-Ile-Lys-	304
Ov: Asp-Val-Leu-Ala-Ser-Arg-Gly-Leu-Ser-Leu-Ile-Met-Arg-Leu-Glu-Asn- E: Gly-(Gly ₁ , Leu ₁ , Ser ₁)-Met-Arg-Leu-Glu-Asn-	320
Ov: Trp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Asp-Glu E: Trp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Asp-Glu	329

Abb. 14: Vergleich von Aminosäuresequenzen der α -Untereinheit der RNA-Polymerase nach Ovchinnikov et al. (Ov) mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultaten (E)

II. Vergleichende proteinchemische Analyse von T4 modifizierter und T4 alterierter DNA-abhängiger RNA-Polymerase

1. Einleitung

Es ist seit langem bekannt, daß im Verlauf der Infektion von *Escherichia coli* durch den Bakteriophagen T4 die DNA-, RNA und Proteinsynthese des Wirtsbakteriums gehemmt wird (26). Die nähere Untersuchung der DNA- und RNA-Synthese des Wirts zeigte, daß die DNA-Synthese etwa eine Minute nach der Infektion völlig zum Stillstand kommt (13). Innerhalb der gleichen Zeit sinkt auch die wirtsspezifische RNA-Synthese bis auf wenige Prozent der uninfizierten Kontrolle ab und kann in diesem geringen Ausmaß noch drei bis fünf Minuten nach Infektion nachgewiesen werden (27,28,29,30,31,32). Für diesen raschen Abfall der DNA- und m-RNA-Synthese des Wirtsbakteriums ist keine Synthese eines Virus-codierten Proteins erforderlich (33,34). Ebenfalls ohne Proteinsynthese treten an der Transkriptase der befallenen Zelle direkt nach Infektion strukturelle Veränderungen auf (35,36,37), weshalb vermutet wurde, daß ein Zusammenhang zwischen dieser Veränderung der RNA-Polymerase - der Alteration - und dem Abschalten der RNA-Synthese des Wirtsbakteriums besteht.

Parallel zur Abschaltung der wirtsspezifischen RNA-Synthese beginnt die Transkription verschiedener Klassen von T4-Genen (38,39,40,41,42). Dabei befindet sich unter den sogenannten frühen Genprodukten ein Enzym, das die Wirtstranskriptase - wie im Verlauf der Alteration - strukturell verändert (36,37,38). Dieses veränderte Enzym, die "modifizierte" RNA-Polymerase, wird bis zum Ende des Infektionsprozesses zur Expression der Phagengene verwendet (43), und es wird vermutet, daß die Modifikation zur Hemmung der wirts-

eigenen RNA-Synthese beiträgt, da die modifizierte Polymerase bestimmte Wirtsgene nicht mehr in dem ursprünglichen Ausmaß transkribieren kann (46).

Die Alteration und die Modifikation zeigen also wahrscheinlich ähnliche Wirkungen auf die Regulation der Genexpression nach Infektion von E.coli durch den Bakteriophagen T4. Der Erforschung dieser Reaktion gilt deshalb besonderes Interesse, und darüber hinaus auch deshalb, weil es sich dabei um den speziellen Fall der Regulation der Transkription durch strukturelle Veränderung der Transkriptase handelt, wie es auch bei dem T3- und T7-Infektionszyklus vorkommt (93, 96, 97). Die Klärung der Art dieser strukturellen Veränderung ist daher von grundlegender Bedeutung für das Verständnis dieses Regulationsphänomens.

Die die Alteration bzw. die Modifikation katalysierenden Enzyme haben - neben Unterschieden in ihrer Struktur, in der Spezifität und der Vollständigkeit der Umsetzung (vergl. Abschn. 2.1. und 3.1.) - verschiedene Herkunft. Während das die Alteration katalysierende Enzym, die Alterationstransferase, ein Protein ist, das der Phage T4 mit der DNA in die Wirtszelle injiziert, stellt die Modifikationstransferase ein im Wirt synthetisiertes T4-Genprodukt dar. Trotz dieser Unterschiede wird - wie in den letzten Jahren gezeigt werden konnte (13, 44, 45) - durch beide Enzyme ein ADP-Riboserest mit einem basischen Aminosäurerest der α -Untereinheit kovalent verknüpft.

Die nähere proteinchemische Analyse der derart veränderten α -Untereinheit ist Gegenstand dieses Teils der vorliegenden Arbeit.

2. Proteinchemische Analyse von T4-modifizierter DNA-abhängiger RNA-Polymerase

2.1. Einführung

Die Modifikation der RNA-Polymerase erfolgt in T4-infizierten Zellen zwischen 2 und 4 Minuten nach der Infektion bei 37° C. Dabei wird ein ADP-Riboserest aus NAD^+ auf die α -Untereinheit

Übertragen, und der angeheftete Rest bleibt während des gesamten Infektionszyklus stabil gebunden (35). Das diese Reaktion katalysierende Enzym, die Modifikationstransferase, hat ein Molekulargewicht von 30000 Daltons (47) und besitzt eine große Spezifität. Es wird ein ADP-Riboserest auf jede α -Untereinheit übertragen. Das Erscheinen der Modifikationstransferase ist durch Chloramphenicol und andere Inhibitoren der Proteinsynthese hemmbar. Desgleichen unterdrückt der Zusatz von Rifampicin - eines Inhibitors der RNA-Polymerase - selbst noch kurz nach Infektion die Expression des mod-Genes vollständig (37).

Welche Aminosäure der α -Untereinheit ADP-ribosyliert wird, ist bislang umstritten. Einigkeit herrscht darüber, daß der ADP-Riboserest kovalent an eine basische Aminosäure gebunden ist, jedoch ist sowohl die Sequenz, die die betreffende Aminosäure umgibt, als auch die Aminosäure selbst (Lysin - Arginin ?) nicht gesichert (44,45).

In der vorliegenden Arbeit ist versucht worden, die diesbezüglichen Unklarheiten zu beseitigen. Modifiziertes α wurde tryptisch verdaut. Das ADP-ribosylierte Peptid wurde isoliert, charakterisiert und mit Thermolysin nachgespalten. Die isolierten und charakterisierten thermolytischen modifizierten Peptide ließen zusammen mit dem tryptischen modifizierten Peptid die ADP-ribosylierte Aminosäure erkennen und in die Sequenz von α einordnen.

2.2. Untersuchungen an tryptisch verdauter modifizierter α -Untereinheit

Die tryptische Spaltung der α -Untereinheit der RNA-Polymerase ist unter I.3.1. beschrieben worden.

Die α -Untereinheit der modifizierten Polymerase enthält einen ADP-Riboserest kovalent an einer basischen Aminosäure gebunden (44,45). Wegen einer derartigen Maskierung der basischen Sei-

tenkette der betreffenden Aminosäure (Strukturvorschlag s.u. 48,49) ist zu erwarten, daß Trypsin hinter dieser Aminosäure nicht spaltet. Das Peptidmuster der tryptisch gespaltenen modifizierten α -Untereinheit sollte sich im Fingerprint von normalem α durch das Fehlen zweier Peptide und das zusätzliche Auftreten eines Peptidfleckes unterscheiden. Diese Annahme gilt aber nur unter der Voraussetzung, daß der ADP-Riboserest nicht an eine basische Aminosäure gebunden ist, auf die ein Prolin folgt. In diesem Fall würde sich das aus normalem α erhaltene Peptid von dem entsprechenden ADP-ribosylierten Peptid aus modifiziertem α nur durch den ADP-Riboserest unterscheiden. Im Verlauf der Untersuchungen ADP-ribosylierter Peptide hatte es sich herausgestellt, daß die Peptid-ADP-Riboserest-Bindung unter den Bedingungen der Fingerprintanalyse nicht stabil ist (vergl. Abschnitt 2.3.). Aus diesen Gründen mußte in der vorliegenden Arbeit darauf verzichtet werden, im Fingerprint das tryptische ADP-ribosylierte Peptid zu identifizieren und nach der unter I.3.2.2. beschriebenen Methode zu isolieren.

Die im folgenden beschriebene Isolierung des ADP-ribosylierten tryptischen Peptids umfaßt Auftrennungen durch Gelchromatographie und Ionenaustauschchromatographie. Kennzeichnend für die ADP-Ribose war ein Absorptionsverhältnis bei 260 nm und 280 nm mit einem Betrag größer 2.

Aus theoretischen Überlegungen folgt, daß Proteine, deren einziger bei 260 nm absorbierender Chromophor Phenylalanin mit dem sehr kleinen molaren Extinktionskoeffizienten von 195 (bei $\lambda_{\max} = 257,6$ nm) ist (50), nur in ganz speziellen Fällen ein solches Absorptionsverhältnis haben können. Ein Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm mit einem Betrag größer 2 ist nur bei Proteinen mit Polyphenylalaninsequenzen denkbar, denen Chromophore mit Extinktionen um 280 nm fehlen (Tryptophan, Tyrosin). Die α -Untereinheit enthält keine solche Polyphenylalaninsequenzen (8), weshalb ein Vor-täuschen eines ADP-Riboserestes ($\lambda_{\max} = 260$ nm bei pH 7 mit

=14600, 50) durch diesen Chromophor nicht zu befürchten war.

Daß dieser optische Marker ein hinreichender Beweis für das Vorliegen eines ADP-Riboserestes war, ging aus dem direkten Vergleich der aus Gelchromatographie erhaltenen Elutionsdiagramme der tryptischen Hydrolysate von normalem und modifiziertem α hervor (Abb. 8 - 15).

Einen endgültigen Beweis lieferten Ergebnisse, bei denen von ^{32}P -markiertem modifiziertem α ausgegangen worden war. In jedem Fall war der radioaktive Marker (Aminosäure-Ribose- ^{32}P - ^{32}P -Ribose-Adenin) mit dem optischen Marker deckungsgleich.

2.2.1. Tryptische Spaltung von modifiziertem α

Die tryptische Spaltung von modifiziertem α ergibt nach Auftrennung über Sephadex LH 60 zwei Fraktionen mit einem signifikant erhöhten Absorptionsverhältnis bei 260 nm und 280 nm: Fraktion M-T-4 mit 2,2 und Fraktion M-T-8 mit 2,05 (Abb. 15).

Die Fraktion M-T-8 wurde einer weiteren Gelchromatographie über Biogel P 2 unterworfen (Abb. 16). Das Elutionsvolumen der Fraktion M-T-8-3 entsprach einem Molekulargewicht von etwa 500 Daltons. Die Vermutung lag daher nahe, daß es sich bei dieser Fraktion um ein unter den Chromatographiebedingungen (pH2) abgespaltenes adeninhaltiges Produkt des ADP-ribosylierten Peptids handelt - insbesondere deshalb, weil die Aminosäureanalyse dieser Fraktion außer dem aus Adenin stammenden Glycin (17,44) keine Aminosäure zeigte, und weil unter milderen Chromatographiebedingungen der Anteil der Fraktion M-T-8 stark absinkt. Um welches Produkt es sich dabei allerdings handelt, blieb unklar. Die dünnschichtchromatographische Analyse zeigt einen Fleck etwas oberhalb von ADP und ADP-Ribose; er ließ sich jedoch im Gegensatz zu den beiden Nucleosidphosphaten mit Ninhydrin anfärben (Abb. 17).

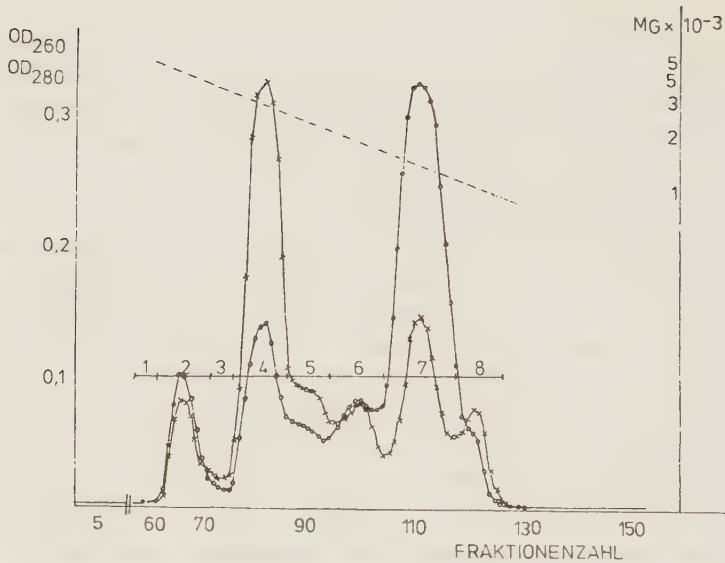


Abb. 15: Chromatographie eines tryptischen Verdaues von modifiziertem α über Sephadex LH 60

40 mg tryptisch verdautes carboxymethyliertes modifiziertes α wurde auf eine Sephadex LH 60 Säule (150x2 cm) aufgetragen. Elutionsmittel: 10 %ige Essigsäure, Fraktionsgröße: 1,5 ml. o—o: OD₂₈₀, x—x: OD₂₆₀, ---: Molekulargewicht

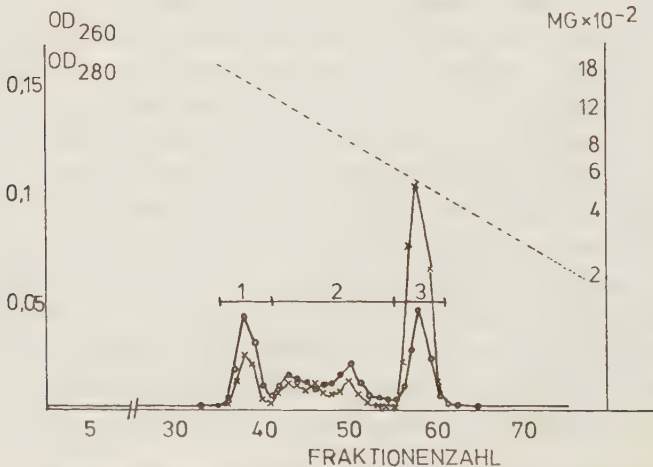
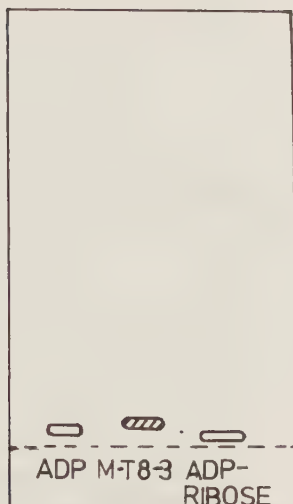


Abb. 16: Chromatographie der Fraktion M-T-8 über Biogel P2

Fraktion M-T-8 wurde auf eine Biogel P2 Säule (100x1 cm) aufgetragen. Elutionsmittel: 50 mM Essigsäure, Fraktionsgröße: 1 ml. o—o: OD₂₈₀, x—x: OD₂₆₀, ---: Molekulargewicht

Abb. 17: Dünnschichtchromato-
graphische Analyse
von M-T-8-3



2.2.2. Isolierung und Charakterisierung des modifizierten tryptischen Peptids

Die Fraktion M-T-4 wurde durch Chromatographie über DEAE-Cellulose gereinigt (Abb. 18). Dabei wurde neben der Fraktion M-T-4-3 eine Nebenfraktion, M-T-4-5, erhalten, die ebenfalls ein ADP-ribosyliertes Peptid enthielt. Die Konzentration dieser Nebenfraktion erreichte allerdings nur maximal 10 % von M-T-4-3. Da bekannt ist, daß α im Verlauf der Modifikation nur einmal ADP-ribosyliert wird (47), muß geschlossen werden, daß es sich bei dieser Nebenfraktion um ein M-T-4-3 überlappendes Peptid handelt.

Nur für den Fall, daß eine möglicherweise unsymmetrische Orientierung der beiden α -Untereinheiten zu einer Modifikation an zwei verschiedenen Orten führen sollte, wäre es denkbar, daß eine tryptische Spaltung zwei verschiedene einander nicht überlappende ADP-ribosylierte Peptide ergeben würde. In dem Fall müßten aber die Konzentrationen beider tryptischen Peptide identisch sein, da bei vollständiger Modifikation alle α -Untereinheiten jeweils einen ADP-Riboserest enthalten.

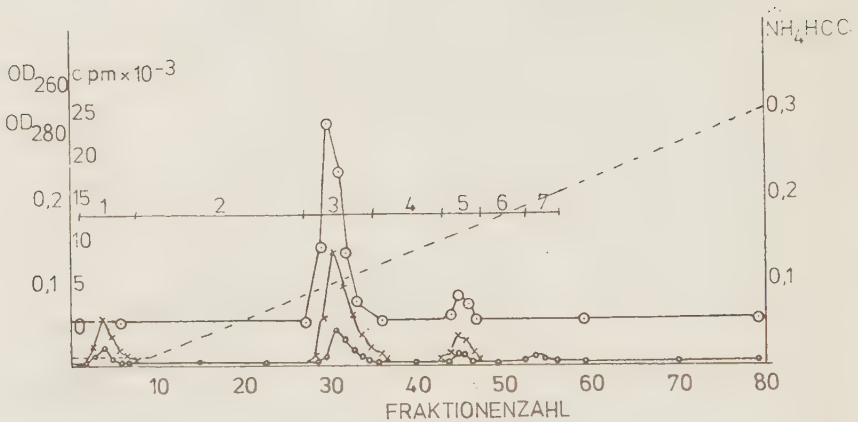


Abb. 18: Chromatographie der Fraktion M-T-4 über DEAE-Cellulose

Die Fraktion M-T-4 wurde über eine DEAE-Cellulosesäule (10x1,1 cm) aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten (2x50 ml 10 - 200 mM Ammoniumhydrogencarbonat). Fraktionsgröße: 1 ml. o—o: OD₂₈₀, x—x: OD₂₆₀, ●—●: Radioaktivität aus ³²P-markierter ADP-Ribose, ---: NH_4HCO_3 -Konzentration

Die Fraktion M-T-4⁻² wurde durch Chromatographie über Sephadex G 25 nachgereinigt (Abb. 19). Dabei eluiert M-T-4-3-2 - im Folgenden M-T IV - nahe dem Ausschlußvolumen bei etwa 3500 Daltons. Die Aminosäurezusammensetzung und die N-terminale Aminosäure sind in der Tabelle 6 angegeben.

Das UV-Absorptionsspektrum eines ADP-ribosylierten Peptids, dem ein längerwelliger Chromophor als Adenin (Tyrosin oder Tryptophan) fehlt, sollte einen Gipfel oder zumindest eine deutliche Schulter bei einer etwas niedrigeren Wellenlänge haben als derjenigen, bei der Adenin sein Absorptionsmaxi-

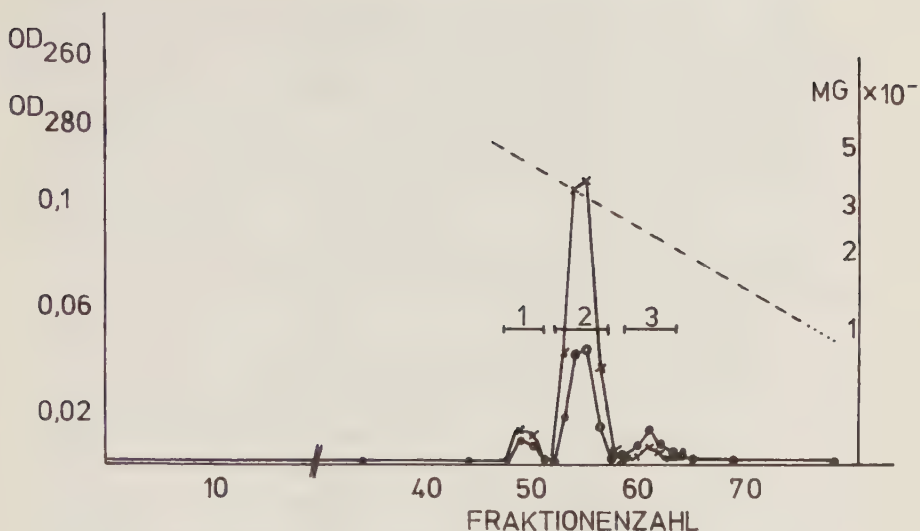


Abb. 19: Chromatographie der Fraktion M-T-4-3 über Sephadex G 25

Die Fraktion M-T4-3 wurde über Sephadex G 25 nachgereinigt (Säulendimension: 120x1cm). Elutionsmittel: 50 mM Essigsäure, Fraktionsgröße: 1 ml, o—o: OD₂₈₀, x—x: OD₂₆₀, ●—●: Radioaktivität aus ³²P-markierter ADP-Ribose, ---: Molekulargewicht

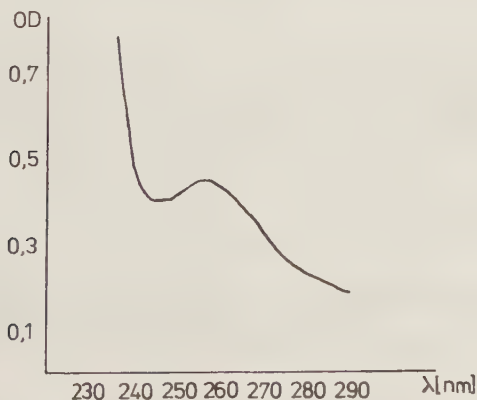


Abb. 20: UV-Absorptionsspektrum der Fraktion M-T IV

Aminosäure	M-T IV
Tryptophan	-
Lysin	2,02
Histidin	-
Arginin	2,05
Carboxymethyl- cystein	+
Asparaginsäure	4,92
Threonin	0,82
Serin	0,85
Glutaminsäure	4,07
Prolin	2,98
Glycin	0,52
Alanin	0,99
Valin	1,90
Methionin	-
Isoleucin	1,12
Leucin	4,89
Gesamt	28
N-Terminus	Glx

Tab. 6: Aminosäurezusammensetzung und N-Terminus von M-T IV

mun hat. Das Peptid M-T IV erfüllt diese Forderung, was ein zusätzlicher Beweis für das Vorliegen eines ADP-ribosylierten Peptids ist (Abb. 20).

2.3. Thermolytische Spaltung von M-T IV

Das Peptid M-T IV besteht aus 28 Aminosäuren (vergl. 2.4.). Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung und der N-terminalen

Sequenz läßt sich dieses Peptid mit sehr großer Wahrscheinlichkeit innerhalb der α -Sequenz an den Orten 244-271 einordnen (8). Das Peptid M-T IV enthält noch mehrere mögliche Akzeptorstellen für die ADP-Ribose (vergl. Abb. 26). Neben vier basischen Aminosäuren, die als Bindungsort beschrieben wurden (44,45), kommen noch Glutaminsäure, Asparaginsäure, Threonin und Serin aufgrund der funktionellen Gruppen ihrer Seitenketten als Akzeptor für die ADP-Ribose in Frage. Cystein scheidet aus, da ADP-Ribosylcystein sich entweder nicht hätte carboxymethylieren lassen oder sich unter Carboxymethylierungsbedingungen zersetzt hätte. Das Vorliegen von Carboxymethylcystein in dem ADP-ribosylierten Peptid spricht gegen diese Möglichkeit. Aus diesen Gründen war eine weitere Eingrenzung des Ortes der ADP-Ribosylierung nötig.

Ovchinnikov et al. hatten im Rahmen ihrer Sequenzanalyse gerade aus diesem Bereich von α thermolytische Peptide erhalten (8), die auch für den Zweck des Eingrenzens des Ortes der ADP-Ribosylierung eine große Hilfe zu sein versprochen. Es wurde daher das unter 2.2.2. beschriebene tryptische Peptid einer thermolytischen Hydrolyse (51 - 57) unterworfen und anschließend durch Gelchromatographie über Biogel P 2 fraktioniert (Abb. 21).

Es wurden drei Fraktionen mit signifikant erhöhtem Absorptionsverhältnis bei 260 nm und 280 nm erhalten. Dabei war die Ausbeute der Peptide M-T IV-Th-2 (im Folgenden Th-2), M-T IV-Th-4 (im Folgenden Th-4) und M-T IV-Th-6 (im Folgenden Th-6) abhängig von der Inkubationsdauer der Thermolysinspaltung und der Proteasekonzentration. Durch Verlängerung der Inkubationsdauer und gleichzeitiger Erhöhung der Proteasekonzentration konnte die Ausbeute der Peptide Th-2 und Th-4 zugunsten des Peptids Th-6 verringert werden (vergl. Abb. 21 mit Abb. 24), was für unvollständigen Verdau und das Vorliegen von Überlappungspeptiden spricht.

Die Nachreinigung und Charakterisierung dieser Peptide wird in den folgenden Abschnitten beschrieben.

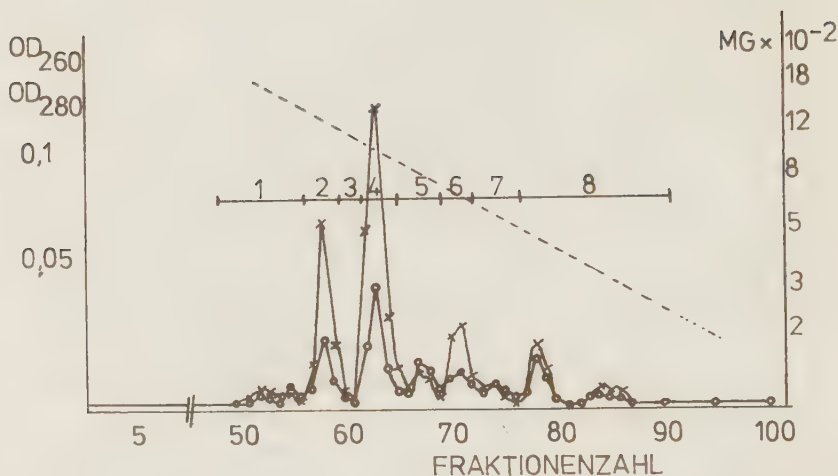


Abb. 21: Chromatographie eines thermolytischen Verdaues von M-T IV über Biogel P 2

Thermolytisch gespaltenes M-T IV wurde auf einer Biogel P 2 Säule (100x1,5 cm) fraktioniert. Elutionsmittel : 50 mM Essigsäure, Fraktionsgröße: 0,8 ml. o—o:OD₂₈₀, x—x:OD₂₆₀, —: Molekulargewicht

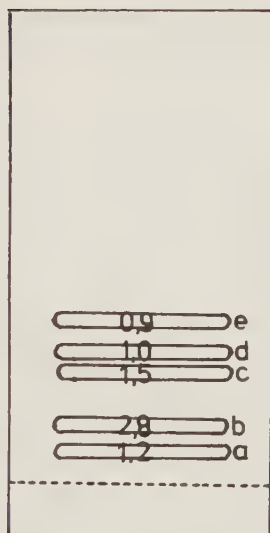
2.3.1. Isolierung und Charakterisierung von Th-2-b

Die Fraktion Th-2 wurde nahe dem Ausschlußvolumen bei einem Molekulargewicht von etwa 1400 Daltons eluiert. Die weitere Reinigung erfolgte dünnsschichtchromatographisch (Abb. 22). Die einzelnen Banden, die durch präparative Dünnschichtchromatographie wie unter I.3.2.2. beschrieben erhalten wurden, wurden eluiert und auf ihre optischen Eigenschaften hin untersucht. Die Bande b hatte als einzige ein signifikant erhöhtes Absorptionsverhältnis bei 260 nm und 280 nm.

Die Aminosäurezusammensetzung und der N-Terminus von Th-2-b ist in der Tabelle 7 wiedergegeben.

Abb. 22: Dünnschichtchromato-
graphische Reinigung
von Th-2

Die in den einzelnen Banden
aufgeführten Zahlenwerte geben
die Absorptionsverhältnisse
bei 260 nm und 280 nm der aus
den Banden eluierten Peptide
wieder



2.3.2. Isolierung und Charakterisierung von Th-4-c-1

Das Elutionsvolumen, bei dem die Fraktion Th-4 eluiert wurde,
entspricht einem Molekulargewicht von etwa 1100 Daltons.

Auch hier erfolgte die weitere Reinigung dünnschichtchromato-
graphisch.

Eine Auftrennung im System N-Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser=
68/14/40/25 auf Kieselgeldünnschichtplatten erwies sich als
nicht ausreichend, wie die Endgruppenbestimmung zeigte. Daher
mußte eine Nachreinigung der Bande c auf Kieselgelplatten
im System Methanol/Chloroform/17 %iger Ammoniak=2/2/1 erfolgen
(Abb. 23). Die Ausbeute war durch diesen doppelten Chromato-
graphieschritt allerdings sehr schlecht - wahrscheinlich auf-
grund der partiellen Zersetzung der ADP-Ribose-Peptid-Bin-
dung (vergl. 2.3.3.).

Die Aminosäurezusammensetzung und der N-Terminus von Th-4-c-1
ist in der Tabelle 7 wiedergegeben.

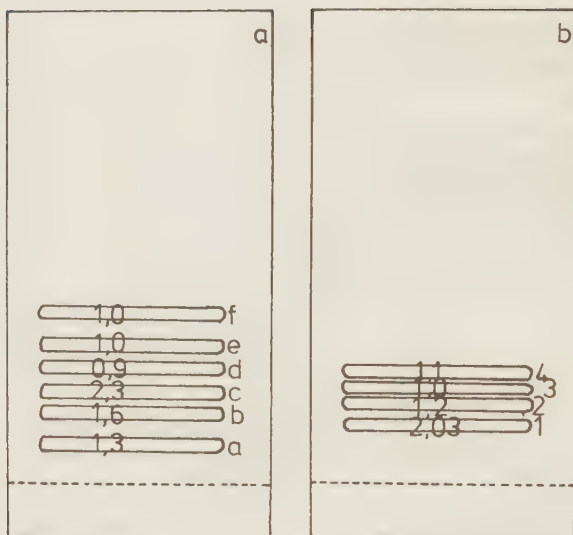


Abb. 23: Chromatographische Reinigung von Th-4

Die in den einzelnen Banden aufgeführten Zahlenwerte geben die Absorptionsverhältnisse bei 260 nm und 280 nm der aus den Banden eluierten Peptide wieder. a: Dünnschichtchromatographie von Th-4, b: Dünnschichtchromatographie der Bande c aus a

2.3.3. Isolierung und Charakterisierung von Th-6-a-1

32 P-markiertes M-T IV wurde unter etwas veränderten Bedingungen einer thermolytischen Hydrolyse unterworfen (s.u. Material und Methoden) und anschließend über Biogel P 2 fraktioniert (Abb. 24). Unter diesen Spaltungsbedingungen war die Ausbeute von Th-2 und Th-4 zugunsten der Fraktion Th-6 zurückgegangen. Das Elutionsvolumen von Th-6 entspricht einem Molekulargewicht von etwa 800 Daltons. Wieder erfolgte die Nachreinigung dünnschichtchromatographisch. Dabei wurde festgestellt, daß unter den Chromatographiebedingungen Radioaktivität abgespalten wird und gleichzeitig aus der homogenen Peptidbande a drei Banden mit unterschiedlichen Laufeigenschaften entstehen (Abb. 24).

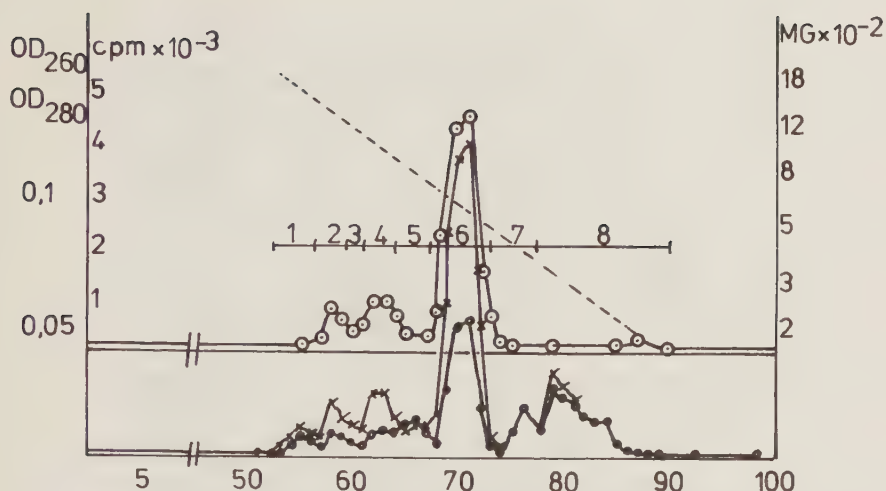


Abb. 24: Chromatographie von ^{32}P -markiertem, thermolytisch verdauten M-T IV über Biogel P 2

Chromatographiebedingungen und Symbolik wie unter Abb. 21.
Zusätzlich Radioaktivität aus ^{32}P -markierter ADP-Ribose: ●—●

Durch Vergleich der eingesetzten Radioaktivität mit der in der Bande a Verbliebenen konnte das Ausmaß der Zersetzung zu 45 % bestimmt werden.

Durch Aminosäureanalyse sowie Endgruppenbestimmung konnte dieses Peptid weiter charakterisiert werden (Tab. 9).

Durch Vergleich der Aminosäurezusammensetzungen und Endgruppen zeigte es sich, daß das große thermolytische Peptid Th-2 die kleineren, Th-4 bzw. Th-6, überlappt, und daß das kleinste thermolytische modifizierte Peptid Th-6 von den beiden größeren überlappt wird (vergl. Abb. 26).

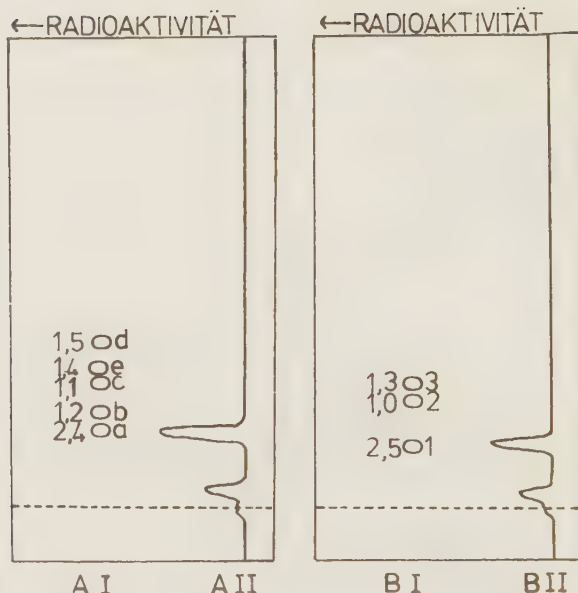


Abb. 25: Dünnschichtchromatographie der Fraktion Th-6

Die neben den einzelnen Flecken aufgeführten Zahlenwerte geben die Absorptionsverhältnisse bei 260 nm und 280 nm der aus den Banden eluierten Peptide wieder. Nach der Chromatographie wurden die Dünnschichtplatten auf ^{32}P -Radioaktivität hin gescannt: A II und B II. A I: Dünnschichtchromatographie der Fraktion Th-6. B I: Dünnschichtchromatographie der aus A I isolierten Bande a

2.4. Sequenzanalysen und Diskussion

Um die ADP-ribosylierten Peptide zweifelsfrei in die von Ovchinnikov et al. publizierte Primärstruktur von α einordnen zu können, wurde der N-terminale Bereich von M-T IV in einem Sequenator (liquid phase, Beckman) und die Sequenz von Th-6-a-1 durch manuellen Edman-Abbau ermittelt (Tab.8).

Bei der Sequenzanalyse von Th-6-a-1 konnte kein Glycin gefunden werden, das bei allen ADP-ribosylierten Peptiden

Aminosäure	Th-2-b	Th-4-c-1	Th-6-a-1
Tryptophan	-	-	-
Lysin	-	-	-
Histidin	-	-	-
Arginin	1,00	0,98	1,00
Carboxymethyl- cystein	+	-	-
Asparaginsäure	1,02	-	-
Threonin	0,86	0,85	-
Serin	0,92	0,85	0,90
Glutaminsäure	1,01	0,99	-
Prolin	-	-	-
Glycin	0,56	0,49	0,44
Alanin	0,97	-	-
Valin	0,92	0,95	0,91
Methionin	-	-	-
Isoleucin	-	-	-
Leucin	1,99	1,95	-
Gesamt	10	7	3
N-Terminus	Leu	Leu	Val

Tab. 7: Aminosäurezusammensetzung und N-Termini der ADP-
ribosylierten thermolytischen Peptide

M-T IV : Glu-Glu-Lys-Pro-Glu-Phe-Asp-Pro-Ile-Leu-Leu-Arg-Pro-Val-

Th-6-a-1 : Val-Arg-Ser

Tab. 8: N-terminale Sequenzen der Peptide M-T IV und Th-6-a-1

in substöchiometrischem Verhältnis in der Aminosäureanalyse erschien. Der Grund für die Glycinwerte aus den Aminosäureanalysen liegt in der Beobachtung, daß sich Adenin unter Totalhydrolysebedingungen für die Aminosäurebestimmungen zersetzt, wobei u.a. Glycin entsteht (17,44). Es kann also davon ausgegangen werden, daß die beschriebenen ADP-ribosylierten Peptide kein Glycin enthalten.

In der Sequenz des Peptids Th-6-a-1 sind die Seitenketten zweier Aminosäuren enthalten, Arg und Ser, die aufgrund ihrer funktionellen Gruppen als mögliche Bindungspartner für die ADP-Ribose in Frage kommen (Abb. 26).

Ein wichtiger Hinweis für die Funktion des Arginins als Akzeptoraminosäure für die ADP-Ribose ist die Tatsache, daß das Peptid Th-6-a-1 aus einem tryptischen Peptid erhalten worden ist, daß also in dem tryptischen ADP-ribosylierten Peptid eine intakte Sequenz Arg-Ser vorliegt. Dieser Befund spricht dafür, daß dieses Arginin durch die ADP-Ribose derart maskiert ist, daß sie von Trypsin nicht mehr als Spaltstelle erkannt wird. Die Sequenz Arg-Ser wird normalerweise gespalten (58 - 62).

Dieser Hinweis auf die Funktion des Arginins als Akzeptorgruppe für die ADP-Ribose wird durch die Arbeit von Goff unterstützt (44), der aus einer Hydrolyse von modifiziertem α mit Pronase zwei Peptide erhalten hat, die mit ihrer Sequenz Thr-Val-Arg und Val-Arg das Peptid Th-6-a-1 zum Teil überlappen (Abb. 26).

Die Sequenzen Val-Arg-Ser und Thr-Val-Arg sind in der von Ovchinnikov et al. publizierten Primärstruktur von α enthalten und entsprechen den Aminosäuren 264-266 bzw. 263-265 (vergl. Abb. 26, 8). Die ebenfalls ADP-ribosylierten thermolytischen Peptide Th-2-b und Th-4-c-1, Überlappungspeptide von Th-6-a-1, entsprechen ihrer Aminosäurezusammensetzung nach den Aminosäuren 260-269 bzw. 260-266. Das tryptische Peptid M-T IV entspricht den Aminosäuren 244-271. Bei dem den ADP-Riboserest tragenden Arginin muß es sich

M-T IV: E-E-K-P-E-F-D-P-I-L-L-R-P-V-D-D-L-E-L-T-V-R-S-A-N-C-L-K
 144 250 255 260 265 271

Th-2: _____
 Th-4: _____
 Th-6: _____
 Goff: { _____
 _____↑
 Arg₂₆₅

Abb. 26: Schema zum Eingrenzen der ADP-ribosylierten Aminosäure in modifiziertem α

Die Indices stellen die Nummern der Aminosäuren innerhalb der Primärstruktur von α nach Ovchinnikov et al. (8) dar.

also um die Aminosäure 265 in der Aminosäuresequenz der α -Untereinheit der RNA-Polymerase handeln.

3. Proteinchemische Analyse von T4-alterierter DNA-abhängiger RNA-Polymerase

3.1. Einführung

Die Alteration stellt - wie die Modifikation - eine Veränderung der Wirtspolymerase dar, die aber - im Gegensatz zur Modifikation - in Abwesenheit wirtseigener Proteinsynthese stattfindet und durch ein vom Bakteriophagen T4 mit der DNA in die Wirtszelle injiziertes Enzym katalysiert wird (35). Die Veränderung ist, wie die Modifikation, eine ADP-Ribosylierung (63), die aber nicht deren Spezifität und Vollständigkeit erreicht. Der Überwiegende Teil des Einbaus von ADP-Ribose erfolgt in die α -Untereinheit (13,63), es werden jedoch in der intakten RNA-Polymerase maximal nur die Hälfte aller α -Untereinheiten erfaßt (63). Wie durch Phosphatmarkierung gezeigt werden konnte, wird neben α auch die σ -Untereinheit und in geringerem Ausmaß noch β' , β und andere Proteine umgesetzt (13,63).

Wie bei modifiziertem α war auch bei der alterierten α -Untereinheit bislang nicht gesichert, welche Aminosäure (Lysin - Arginin?) ADP-ribosyliert ist (44,45,47,63). Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, diese Unklarheit zu beseitigen und eine exakte Zuordnung der als Bindungspartner für die ADP-Ribose dienenden Aminosäure innerhalb der Primärstruktur der alterierten α -Untereinheit zu ermöglichen.

Zu diesem Zweck wurde die alterierte α -Untereinheit tryptisch verdaut. Das tryptische ADP-ribosylierte Peptid wurde gereinigt, charakterisiert und mit dem entsprechenden Peptid aus modifizierter α -Untereinheit verglichen.

3.2.1. Tryptische Spaltung von alteriertem α

Die proteinchemische Analyse der alterierten α -Untereinheit der RNA-Polymerase gelang analog zu der von modifiziertem α . Alteriertes α (Gewinnung s.u. Material und Methoden) wurde carboxymethyliert, tryptisch verdaut und anschließend über Sephadex G 25 fraktioniert (Abb. 27).

Ein Vergleich der Elutionsdiagramme der Chromatographie tryptischer Hydrolysate von modifiziertem α (Abb. 15) und α -Untereinheiten aus alterierter RNA-Polymerase (Abb. 27) zeigt große Ähnlichkeiten. Die Fraktion A-T-3 entspricht dem Elutionsvolumen nach genau der Fraktion M-T-4, ihre Konzentration ist allerdings nur knapp halb so groß wie in dem tryptischen Hydrolysat von modifiziertem α . Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da alterierte RNA-Polymerase nur maximal 50 % ADP-ribosyliertes α enthält (63).

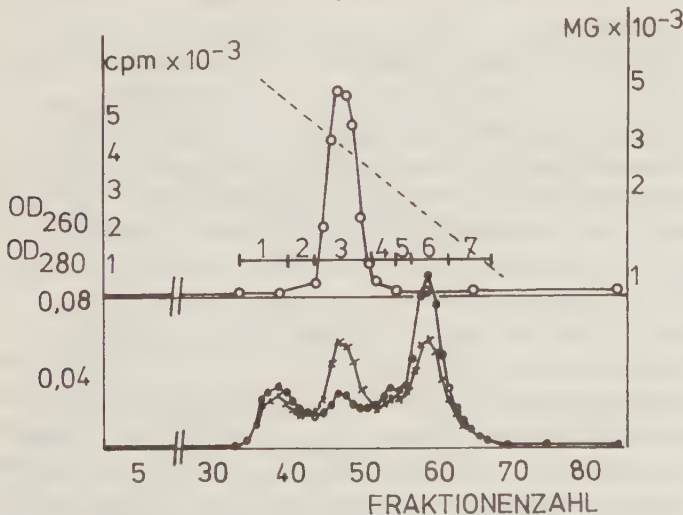


Abb. 27: Chromatographie eines tryptischen Verdaues von alteriertem α über Sephadex G 25

6 mg tryptisch verdautes carboxymethyliertes alteriertes α wurde auf eine Sephadex G 25 Säule (90x1,2 cm) aufgetragen. Elutionsmittel: 50 mM Essigsäure, Fraktionsgröße: 1 ml. o—o:OD₂₈₀, x—x:OD₂₆₀, ●—●:Radioaktivität aus ³²P-markierter ADP-Ribose, ---:Molekulargewicht

Die unter 2.2.1. beschriebene Fraktion M-T-8 fehlt unter den in der Abb. 27 beschriebenen Chromatographiebedingungen. Eine Erklärung dafür ist das schwächer saure Elutionsmittel, in dem die ADP-Riboserest-Peptid-Bindung weniger gespalten wird als in 10 %iger Essigsäure (vergl. 2.2.1.).

3.2.2. Isolierung und Charakterisierung der alterierten tryptischen Peptide

Die Fraktion A-T-³ wurde analog zu der Fraktion M-T-4 weiter gereinigt. Die Chromatographie über DEAE-Cellulose (Abb. 28) lieferte zwei ³²P-haltige Fraktionen, von denen A-T-3-4 bei der gleichen Ionenstärke wie M-T-4-3 eluiert wird.

Die Fraktion A-T-3-6 eluiert bei 0,13 M Salz und entspricht demnach nicht der Fraktion M-T-4-5 (Salzkonzentration bei Elution: 0,165 M), die ein Überlappungspeptid von M-T-4-3 darstellt. Die Aminosäureanalyse von A-T-3-6 zeigt, daß es sich hierbei um ein neues ADP-ribosyliertes Peptid handelt, dem - wie die Aminosäurezusammensetzung und die Endgruppe wahrscheinlich macht - möglicherweise die Aminosäuren 201-219 innerhalb der Primärstruktur von α entsprechen (Abb. 14, Tab. 9). Die Ausbeute von A-T-3-6 beträgt knapp 10 % von A-T-3-4. Damit liegt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um einen zweiten Ort der ADP-Ribosylierung handelt, da bekannt ist, daß α im Verlauf der Alteration zu einem geringen Ausmaß mehrfach ADP-ribosyliert wird (63).

Wie aus der Aminosäureanalyse und der Bestimmung der N-Termini hervorgeht, stellen die Fraktionen A-T-3-4 und A-T-3-6 homogene Peptide dar, so daß eine Nachreinigung durch eine weitere Gelchromatographie nicht notwendig war (vergl. 2.2.2.).

A-T-3-4 (im Folgenden A-T III) hat die gleiche Aminosäurezusammensetzung und den gleichen N-Terminus wie M-T IV (Tab. 9).

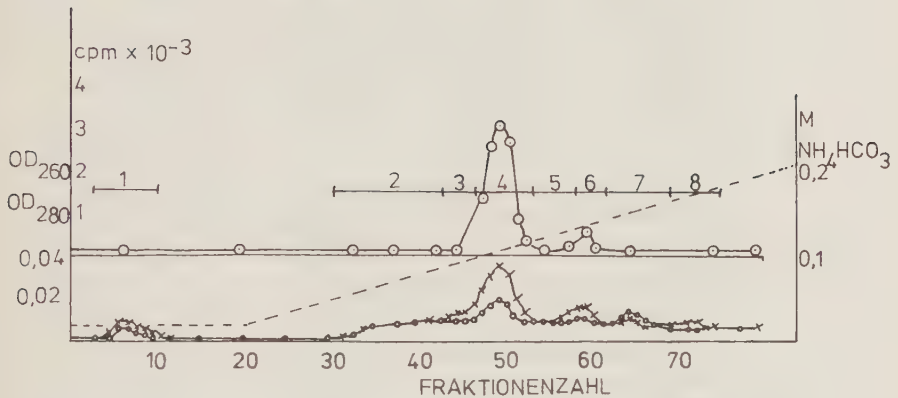


Abb. 28: Chromatographie der Fraktion A-T-3 über DEAE-Cellulose

Die Fraktion A-T-3 wurde über eine DEAE-Cellulosesäule (7x1,1 cm) gereinigt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten (2 x 50 ml: 10 - 250 mM Ammoniumhydrogencarbonat). Fraktionsgröße 1 ml. o—o: OD₂₈₀, x—x: OD₂₆₀, ●—●: ^{32}P -Aktivität, ---: NH_4HCO_3 -Konzentration

Es handelt sich also in beiden Fällen um identische Peptide. Wie daher auch nicht anders zu erwarten war, liefert eine dünn-schichtchromatographische Analyse beider Peptide identische Bilder (Abb. 29). Der dabei beobachteten Aufspaltung der Fraktion A-T III und M-T IV liegt das gleiche Phänomen zugrunde, das bei der dünn-schichtchromatographischen Analyse der thermolytischen modifizierten Peptide beobachtet wurde (vergl. 2.3.3.). Die Rechromatographie der Banden a liefert erneut drei Banden, so daß die Aufspaltung nicht als Verunreinigung aufgefaßt werden kann.

Aminosäure	A-T III	A-T-3-6
Tryptophan	-	-
Lysin	1,99	-
Histidin	-	-
Arginin	2,01	2,00
Carboxymethyl- cystein	+	-
Asparaginsäure	5,02	1,98
Threonin	0,90	1,90
Serin	0,88	-
Glutaminsäure	4,01	4,02
Prolin	2,89	0,97
Glycin	0,53	1,60
Alanin	1,03	0,94
Valin	1,92	0,89
Methionin	-	0,63
Isoleucin	0,92	2,90
Leucin	4,90	0,86
Gesamt	28	19
N-Terminus	Glx	Leu

Tab. 9: Aminosäurezusammensetzungen und N-Termini von A-T III und A-T-3-6

3.3. Zusammenfassung und Diskussion

Die Aminosäure, die in der α -Untereinheit der RNA-Polymerase durch die Modifikationstransferase ADP-ribosyliert wird, konnte aufgrund der unter 2. dargestellten Ergebnisse als der Argininrest 265 in der von Ovchinnikov et al. (8) ermittelten Sequenz von α identifiziert werden. Dieses

Abb. 29: Vergleichende dünn-
schichtchromatogra-
phische Analyse von
A-T III und M-T IV



Ergebnis wurde gewonnen durch Isolierung eines tryptischen einen ADP-Riboserest haltigen Peptids, aus dem drei einander überlappende thermolytische Peptide mit ADP-Ribose-resten erhalten wurden. Damit war - unter Berücksichtigung der von Goff beschriebenen Peptide (vergl. 2.4.) - eine eindeutige Ortsbestimmung möglich.

Das unter 3. beschriebene ADP-ribosylierte Peptid aus alteriertem α , A-T III, ist identisch mit M-T IV. Dieses tryptische alterierte Peptid enthält jedoch mehrere Aminosäuren, die den ADP-Riboserest binden könnten. Durch die Arbeit von Rohrer et al. (63) war bereits ein Hinweis auf die Identität der Aminosäuren gegeben, die in alteriertem und modifiziertem α ADP-ribosyliert sind. Modifizierte Polymerase wird durch isolierte Alterationstransferase nur in sehr geringem Ausmaß ADP-ribosyliert. Wären bei Modifikation und Alteration innerhalb α nicht die selben Aminosäuren ADP-ribosyliert, so hätte modifizierte Polymerase in erheblich größerem Ausmaß in vitro alteriert werden müssen. Darüber hinaus konnte in der gleichen Arbeit wahrscheinlich gemacht

werden, daß der ADP-Riboserest in alterierter RNA-Polymerase an die Guanidogruppe eines Argininrestes gebunden ist. Von den zwei in A-T III enthaltenen Argininen kommt jedoch nur eines als Akzeptoraminosäure für die ADF-Ribose in Frage, da davon ausgegangen werden kann, daß die Aminosäuresequenzen von M-T IV und A-T III miteinander identisch sind und somit auch in dem alterierten Peptid eine Arg-Pro- neben einer Arg-Ser-Sequenz vorliegen muß. Wäre das Arginin der Sequenz Arg-Pro der Bindungsort der ADP-Ribose, so wäre die Existenz der Sequenz Arg-Ser in dem tryptischen Peptid in der beobachteten Ausbeute unerklärlich. Die Sequenz Arg-Ser in dem tryptischen alterierten Peptid ist nur durch die Maskierung des Arginins durch den ADP-Riboserest zu erklären, wie bereits unter 2.4. diskutiert wurde (vergl. Abb. 26). Aus diesen Überlegungen heraus folgt die Identität des Ortes der ADP-Ribosylierung bei der Alteration mit dem bei der Modifikation.

4. Diskussion von Teil II

Die Identität des Ortes der ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit in alterierter und modifizierter RNA-Polymerase legt - trotz nur maximal 50 %iger Umsetzung im ersten Fall aber vollständiger Umsetzung bei der Modifikation - eine analoge Funktionsänderung durch die strukturelle Veränderung in beiden Fällen nahe.

Die geringe Substratspezifität der Alteration ließ die Frage aufkommen, ob die beobachtete ADP-Ribosylierung von Wirtspolymeraseuntereinheiten (35,64) oder die anderer Wirtspoteine die Hauptfunktion der Alterationstransferase in der infizierten E.coli Zelle darstellt (65,66,67,68). Die Untersuchungen von Horvitz, die gezeigt haben, daß die Wirtstranskription auch nach Infektion mit T4_{alt}- abgeschaltet wird (36,37), lassen es möglich erscheinen, daß die Hauptfunktion der Alteration nicht das Abschalten der wirtseigenen Transkription ist.

Es ist beobachtet worden, daß isolierte alterierte Polymerase im Vergleich zu dem Normalenzym einen σ -Mangel aufweist, obwohl σ nach T4 Infektion weder abgebaut noch inaktiviert wird (35,36,69,70,71). Rohrer konnte zeigen, daß die von Seifert et al. beschriebene Änderung der Transkriptionsspezifität durch die Alteration an dem σ -Mangel von alterierter Polymerase liegt (48). Durch Zugabe von normalem σ zu alterierter Polymerase wird die beschriebene Änderung der Transkriptionsspezifität aufgehoben. Diese Ergebnisse legen die Hypothese nahe, daß durch die Alteration eine Affinitätsminderung des Core-Enzyms zu σ bewirkt wird. Die Alteration würde damit eine Rolle bei dem Abschalten der wirtseigenen Transkription erhalten.

Wenn man annimmt, daß durch die Alteration der Polymerase ihre Affinität zu σ derart verringert wird, daß die Anzahl

der freien Holoenzymmoleküle auf die Größenordnung der der T4-Promotoren absinkt, und wenn man weiter annimmt, daß die Freisetzung von σ aus dem Komplex Holoenzym-T4-DNA und damit die Freisetzung der T4-Promotoren etwa so schnell erfolgt wie die Wiedereinstellung des Gleichgewichts Holoenzym $\rightleftharpoons$ Coreenzym + σ an Zeit bedarf, so hat man eine Erklärung dafür, daß nach Alteration fast ausschließlich die Expression der T4-Gene erfolgt. Das folgende hypothetische Modell soll dies verdeutlichen:

Direkt nach Infektion von E.coli durch T4 erfolgt die Alteration der Wirtspolymerase. Dadurch sinkt die Anzahl der Moleküle an freiem Holoenzym auf die Größenordnung der Anzahl der T4-Promotoren. Durch die Stärke der T4-Promotoren (46,49) wird das freie Holoenzym sehr schnell fast ausschließlich durch die Phagenpromotoren gebunden. Die Freisetzung der so blockierten T4-Promotoren, d.h. die Initiation und der Beginn der Elongation der Transkription der T4-Gene, erfolgt so schnell, wie die Nachbildung von freiem Holoenzym aus Core-Enzym und σ in der Wirtszelle an Zeit benötigt. Dieses neu gebildete Holoenzym wird wieder von den T4-Promotoren gebunden u.s.w., so daß die Initiation wirtseigener RNA-Synthese nicht mehr erfolgen kann (35, 72 - 79).

Durch einen solchen Kreislauf würde das σ nach Alteration hauptsächlich der Initiation der Transkription der frühen T4-Gene dienen, und somit würde u.a. die Ausprägung des mod-Genes erfolgen.

Die Modifikationstransferase ruft eine Veränderung der Transkriptionsspezifität der Wirtspolymerase dahingehend hervor, daß bestimmte E.coli Gene nicht mehr in dem ursprünglichen Ausmaß exprimiert werden (46). Unklar bleibt allerdings, ob die veränderte Transkriptionsspezifität darauf zurückzuführen ist, daß modifizierte Polymerase σ nicht mehr ausreichend binden kann, oder ob die ADP-Ribosylierung direkt einen Einfluß auf die Promotor-Enzym-Wechselwirkung hat. Wenn das alterierte Enzym lediglich eine verringerte σ -Affinität zum Core-Enzym haben sollte, nicht dagegen eine veränderte Transkriptionsspezifität (48), so könnte es sich - wegen der Identität des Ortes der ADP-Ribosylierung - bei modifizierter Polymerase ähnlich verhalten (64,80). Durch die ADP-Ribosylierung beider α -Untereinheiten würde eventuell die σ -Bindungsfähigkeit des Core-Enzyms derart erniedrigt, daß die Initiation wirtseigener RNA-Synthese völlig ausbliebe.

Die Bindung anderer T4-codierter regulatorischer Proteine (Genprodukte 33, 45, 55), die offenbar z.T. die σ -Funktion für die Initiation der späten T4-Gene übernehmen (81 - 88), an die modifizierte Polymerase wird möglicherweise durch die ADP-Ribosylierung noch erleichtert.

Die Existenz der Doppelmutante von T4 (89), die weder alternieren noch modifizieren kann, beweist, daß die ADP-Ribosylierung der Wirtspolymerase für die Ausprägung der Phagen-gene nicht essentiell ist. Die Lebensfähigkeit dieser Doppelmutante läßt sich erklären, wenn man annimmt, daß auch normale Polymerase die T4-codierten regulatorischen Proteine binden und so die späten T4-Gene transkribieren kann. Unter der Annahme, daß durch Modifikation und Alteration lediglich die σ -Affinität zum Core-Enzym erniedrigt wird, wird verständlich, daß auch die frühen Gene exprimiert werden können; denn einmal konkurriert die T4-DNA mit der E.coli-DNA, zum anderen sind die T4-Promotoren stärker als die Wirtspromotoren (49). Diese Erklärungsmöglichkeit schließt allerdings eine Verringerung der Wurfgröße ein, da σ mit den T4-codierten regulatorischen Genprodukten konkurrieren würde, so daß nicht die volle Transkriptionskapazität der Zelle für die phagenspezifische Transkription zur Verfügung stehen würde. Diese Beobachtung ist bereits bei der T4-Mutante gemacht worden, die nicht mehr zu modifizieren vermag (36,37, 90).

Dieses hier dargestellte hypothetische Modell der Transkription in T4-infizierten Zellen trägt der biologischen Funktion sowohl der Alteration als auch der Modifikation Rechnung. Durch die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit der RNA-Polymerase wird eine Optimierung der phagenspezifischen Transkription erreicht, indem die σ -Bindungsfähigkeit der Polymerase verringert wird und damit zunächst (Alteration) die Initiation wirtseigener m-RNA-Synthese herabgesetzt, anschließend (Modifikation) völlig unterbunden wird. Damit steht die gesamte Transkriptionskapazität der Wirtszelle der phagenspezifischen Transkription zur Verfügung.

Die in alterierter bzw. modifizierter α -Untereinheit ADP-ribosylierte Aminosäure ist also - zusammen mit den Aminosäuren, die sie in dem räumlichen Aufbau des Proteins umgeben - wahrscheinlich der Ort in α , der für die Bindung von σ verantwortlich ist.

24 oder 25 Aminosäuren von diesem Arginin 265 entfernt in Richtung des C-Terminus (vergl. Abb. 14) ist eine Mutation in α lokalisiert, rpoA 109 (99), die das Wachstum des Phagen P2 auf E.coli verhindert. Die ogr-Mutante des Phagen P2 ist allerdings wieder in der Lage, auf dieser E.coli Mutante zu wachsen. Bei der E.coli Mutante handelt es sich offensichtlich um eine Mutation, durch die die Transkriptionsspezifität der Polymerase dahingehend verändert wird, daß die späten P2-Gene nicht mehr transkribiert werden können. Die ogr-Mutation von P2 überwindet diese Veränderung der Transkriptionsspezifität. Das ogr-Genprodukt dieser Mutation muß also die Veränderung in der α -Untereinheit der Wirtspolymerase kompensieren. möglicherweise handelt es sich bei dem ogr-Genprodukt um ein regulatorisches Protein, das analog zur σ -Funktion die Initiation der Transkription der späten P2-Gene ermöglicht, dabei mit σ um die Bindung an die Transkriptase konkurriert, und durch die Mutation der Polymerase nicht mehr in ausreichendem Maß an das Enzym binden kann.

Durch den Austausch von Leucin durch Histidin in der rpoA 109 Mutation entsteht eine zusätzliche positive Ladung in der α -Untereinheit. Die ADP-Ribosylierung hat möglicherweise die Schwächung der σ -Bindungsfähigkeit der Polymerase zur Folge, was die Ursache für die verminderte wirtsspezifische und damit gleichzeitig vermehrte phagenspezifische Transkription sein könnte. Die ADP-Ribosylierung erhöht die negative Ladungsdichte in dem gleichen Bereich von α , in dem durch die Mutation rpoA 109 die positive Ladungsdichte erhöht wird. Eine erhöhte negative Ladungsdichte vermag die verminderte Bindungsfähigkeit von σ , einem sauren Protein, zu erklären. Die Erhöhung der positiven Ladungsdichte in dem Bereich

des σ -Bindungsortes von α könnte die σ -Bindungsfähigkeit der Polymerase relativ zu regulatorischen phagenspezifischen Genprodukten erhöhen und damit eine Konkurrenz dieser regulatorischen Genprodukte mit σ um die Polymerase zugunsten von σ entscheiden lassen.

Von diesem Standpunkt aus wäre es auch interessant, die σ -Mutante proteinchemisch zu charakterisieren.

Ganz besonders wichtig wäre es darüber hinaus zu wissen, ob der Ort der Mutation $rpoA$ 109 in der räumlichen Struktur der α -Untereinheit tatsächlich in der Nähe des Arginins 265 liegt, daß also durch beide Aminosäuren dasselbe aktive Zentrum erfaßt wird. Eine Entscheidung hierüber kann nur die Röntgenstrukturanalyse bringen.

C. MATERIAL UND METHODEN

I. Material

1. Substanzen

(³ H)-NAD	NEN, Dreieichenhain
(³² P)-anorg. Phosphat	"
(¹⁴ C)-ATP	RCC, Amersham
(¹⁴ C)-NAD	"
(³ H)-Jodessigsäure	"
Triphosphate, unmarkiert	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliantblau	"
Agarose	"
DTE	"
PTH-Aminosäuren	"
Dansyl-Aminosäuren	"
Dansylchlorid	"
DEAE-Cellulose	Whatman, Maidstone
PC-Cellulose	"
Kalbsthymus DNA	Sigma, St.Louis
β-NAD, unmarkiert	"
Pyruvatkinase	Boehringer, Mannheim
PEP	"
Thermolysin	"
Rinderserumalbumin	"
Lysozym	"
DNase I	Worthington
2,5-Diphenyloxazol (PPO)	Interchem, München
1,4-Bis-2(5-phenyloxazolyl)-Benzol (POPOP)	"
2-(4-Biphenyl)-5(p-tert. butyl-phenyl)-1,3,4-oxadiazol (Butyl-PBD)	"

Fluorem	Hofman-La Roche, Basel
Biogel A 1,5 (50 - 100 mesh)	Biorad, München
Biogel P 2	"
Sephadex LH 60	Pharmacia, Uppsala
Sephadex G 50, G 25 (je super-fine), Sephadex G 25 medium	"
Elektrophoresepapier MN 2214	Macherey & Nagel
Cronex 2 Röntgenfilm	du Pont
Jodacetamid	Carl Roth, Karlsruhe
Cellogelstreifen	Chemetron, Milano
Nitrocellulosefilter (Ø 0,45 m)	Sartorius, Göttingen
Cellulose Dünnschichtplatten	Merck, Darmstadt
Kieselgel Dünnschichtplatten	"
Trypsin (TPCK-behandelt)	"
Salze	"
Mikropolyamid-Dünnschichtfolien	Schleicher & Schüll
Polymin P	Geschenk der Fa. BASF, Ludwigshafen

Bakterien und Phagen:

E.coli B	Sammlung Hofschneider
E.coli B/r	C.D. Goff
T4 ⁺	Sammlung Hofschneider und R. Mailhammer
T4 _{alt} ⁻	W. Zillig
T4 _{mod} ⁻	"

2. Lösungen

TMA-Puffer:	0,05 M Tris-Acetat pH 7,5, 0,022 M NH ₄ Cl, 0,01 M β-Mercaptoäthanol, 0,001 M EDTA, 0,01 M Mg-Acetat
TMAG-Puffer:	Wie TMA, jedoch zusätzlich 10 % Glycerin
TA-Puffer:	Wie TMA, jedoch ohne Mg-Acetat

TAG-Puffer:	Wie TMAG, jedoch ohne Mg-Acetat
HP-Puffer:	6 M Harnstoff, 0,01 M Natriumphosphat pH 6,8, 0,01 M β -Mercaptoäthanol
HAHC-Puffer:	6 M Harnstoff, 0,01 M NH_4HCO_3
Borat-Puffer:	6 M Harnstoff, 0,6 M Borsäure- NH_3 pH 9, 0,02 M β -Mercaptoäthanol, 0,01 M EDTA
Carboxymethylier- ungspuffer:	6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Tris-HCl pH 8,1, 0,01 M EDTA
Puffer zur Bakterienlyse:	
Puffer A:	0,01 M Tris-HCl pH 8,1, 0,01 M NaN_3 , 0,1 M NaCl, 20 % Rohrzucker
Puffer B:	0,12 M Tris-HCl pH 8,1, 0,05 M EDTA, 4 mg/ml Lysozym
Puffer C:	1 % Brij 58, 0,4 % Na-Desoxycholat, 0,1 M NaCl, 0,01 M EDTA
Dioxan-(Bray)-Scintillator:	4 g PPO, 0,2 g POPOP, 60 g Naphtha- lin, 100 ml Methanol, 20 ml Äthylenglycol, Dioxan ad 1 l
Toluol-Scintillator:	4 g PPO, 0,3g POPOP, Toluol ad 1 l
Ninhydrin-Färbelösung:	98 ml Aceton, 1 ml Eisessig, 1 ml Py- ridin, 0,1 bzw. 0,3 g Ninhydrin
Fluorescamin-Färbelösung:	99,5 ml Aceton, 0,5 ml Pyridin, 2,5 mg Fluoram

II. Methoden

1. Analytische Methoden

a. RNA-Synthesetest

Es wurde der Einbau von radioaktivem Ribonucleotidtriphosphat in säureunlösliches Material gemessen. Die Reaktionsansätze enthielten in 0,25 ml: 50 μg CT-DNA, 5-10 μg Polymerase,

4 μg Pyruvatkinase, je 0,25 μg der Ribonucleotidtriphosphate (ATP war radioaktiv markiert), 2,5 μMol PEP, 7,5 μM Tris, 7,5 μMol Mg-Acetat, 30 μMol NH_4Cl , pH 7,9 (NH_3). Der Normalansatz wurde 10 min bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 ml Eiswasser und 2 ml 10 %iger TCA gestoppt. Der gesamte Ansatz wurde über Membranfilter filtriert und dreimal mit kalter 5 %iger TCA gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Radioaktivität der Filter gemessen.

b. Test der Alterationsreaktion

Die Ansätze (0,1 ml) enthielten 1-5 μg Alterationsenzym, 15 μg Lysozym, 0,025 μMol $^3\text{H-NAD}$ in TMAG-Puffer. Die Ansätze wurden 30 min bei 15° C inkubiert. Danach wurden die Proteine wie unter a. beschrieben mit TCA gefällt, abgesaugt und gewaschen. Die Radioaktivität auf dem Filter wurde bestimmt.

c. Dünnschichtchromatographische Methoden

Für die Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatten (CB IV) wurde als Laufmittel n-Butanol/Pyridin/Eisessig/wasser=15/10/4/5 benutzt.

Für die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten wurden als Laufmittel n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser=68/40/14/25 und Chloroform/Methanol/17 %iger NH_3 =2/2/1 benutzt.

d. Elektrophoretische Trennmethoden

- α . SDS-Polyacrylamid-Plattengele wurden nach Laemmli (91) hergestellt. Exponentielle Gradientengele (5-25 %) wurden nach Mirault und Scherrer hergestellt (92).
- β . Die Cellogelelektrophorese erfolgte nach Palm et al. (93).

e. Analytischer Fingerprint

10-50 nM Peptidgemisch wurde auf eine Kieselgeldünnschichtplatte aufgetragen und in erster Dimension elektrophoretisch aufgetrennt. Elektrophoresepuffer: 2 M Essigsäure, 0,3 M Ameisensäure. Die Elektrophoresedauer bei 50 Watt betrug 1 h. In zweiter Dimension senkrecht zur Elektrophorese erfolgte die dünnschichtchromatographische Auftrennung mit n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser=68/40/14/25.

f. Endgruppenbestimmung mit Dansylchlorid (93,94,95)

1-5 nM Peptid wurden mit 20 μ l 0,1 M NaHCO_3 versetzt und 10 μ l einer 1 %igen Lösung von Dansylchlorid in Aceton zugefügt. Anschließend wurde bei Zimmertemperatur 1 h inkubiert. Nach dem Trocknen erfolgte Hydrolyse mit 0,2 ml 5,7 N HCl bei 110° C für 7 h.

Nach Trocknung wurde das Hydrolysat in 20 μ l Aceton/HCl=19/1 aufgenommen und die Endgruppe durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf beidseitig beschichteten Polyamiddünnschichtfolien (5x5 cm) identifiziert:

1. Dimension: 1,5 % ige Ameisensäure

2. Dimension: Benzol/Eisessig=9/1

Essigsäureäthylester/Methanol/Eisessig=20/1/1

Für die Trennung von DANS-Arg, DANS-His und DANS- ϵ -Lys wurde in zweiter Dimension als zweites Laufmittel benutzt:

NaH_2PO_4 (0,05 M) in 25 %igem Äthanol

g. Aminosäureanalysen

Zur quantitativen Aminosäureanalyse in einem modifizierten Unichrom-Aminosäureanalysator (Beckman, München) mit gesteigerter Empfindlichkeit bis ca. 1 nM (14) wurden 2 bis 10 nM Peptid mit 5,7 N HCl unter Stickstoffatmosphäre in zugeschmolzenen Glasröhrchen hydrolysiert für 20 bis 100 h bei

110° C. Nach Entfernung der Salzsäure im Heizexsiccator wurde der Rückstand in 0,2 ml Puffer pH 2 aufgenommen und 100 µl davon gegen einen Standard im Aminosäureanalysator bestimmt. Unter den beschriebenen Hydrolysebedingungen wird Methionin, Cystein und Tryptophan zerstört. Zum Schutz des Tryptophans erfolgte die Hydrolyse bei tryptophanhaltigen Peptiden in Gegenwart von 0,1 % Thioglycol (99,100).

Zur quantitativen Bestimmung von Cystein und Methionin erfolgte eine Oxidation des Peptids mit Perameisensäure (101,102). Nach Hydrolyse unter Normalbedingungen erfolgte die Bestimmung des Methioninsulfons und der Cysteinsäure gegen einen Standard.

Zur quantitativen Bestimmung von Homoserin erfolgte nach Trocknung des Hydrolysats eine Umwandlung des darin enthaltenen Homoserinlaktons in Homoserin durch Inkubation unter Stickstoff in einem zugeschmolzenen Reagenzglas mit 0,1 M Pyridin-Acetat pH 6,5 für 1 h. Nach Trocknung erfolgte die Aminosäureanalyse gegen einen Standard.

h. Sequenzanalysen

- α. Der manuelle Edman-Abbau (19,20,21) wurde wie unter (22) beschrieben durchgeführt.
- β. Der automatische Edman-Abbau von CB IV nach der Solid-Phase Technik wurde wie unter (103) beschrieben durchgeführt.
- γ. Der automatische Edman-Abbau von M-T IV wurde in einem Liquid-Phase Sequenator (Beckman) wie unter (104) beschrieben durchgeführt.

Die Umwandlung der abgespaltenen Anilidothiazolinonderivate in die entsprechenden PTH-Aminosäuren erfolgte nach Edman (23). Die Identifizierung der nach α erhaltenen PTH-Aminosäuren erfolgte durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf beidseitig beschichteten Polyamiddünnschichtfolien.

1. Dimension: Toluol/n-Pentan/Eisessig=60/30/35

Das Laufmittel enthielt 250 mg/l Butyl-PED

2. Dimension: 35 %ige Essigsäure

Die Identifizierung der nach β erhaltenen PTH-Aminosäuren erfolgte gaschromatographisch und massenspektrographisch (24). Die Identifizierung der nach γ erhaltenen PTH-Aminosäuren erfolgte gaschromatographisch und dünnschichtchromatographisch (105).

- i. Standardproteinbestimmungen erfolgten nach Heil und Zillig (10).
- k. Proteinbestimmungen mit Ninhydrin nach algalischer Hydrolyse erfolgte nach Hirs, Moore und Stein (60).

2. Präparative Methoden

a. Isolierung der RNA-Polymerase aus E.coli

Die RNA-Polymerase aus E.coli wurde nach (106) isoliert. Als weiterer Reinigungsschritt wurde eine DNA-Agarose-Säule (107) angeschlossen.

b. Gewinnung von T4-infizierten Bakterien unter Modifikationsbedingungen

Bakterien, die 8 - 10 min nach T4-Infektion (moi 5 - 8) geerntet wurden, enthielten modifizierte Polymerase.

c. Isolierung der α -Untereinheit aus der RNA-Polymerase

RNA-Polymerase in HP-Puffer wurde auf eine mit dem selben Puffer äquilibrierte Hydroxylapatitsäule (40 ml Säulenvolumen pro 100 mg Enzym) gegeben (108). Die α -Untereinheit erschien bei der vorgelegten Ionenstärke als einzige der Untereinheiten der Polymerase im Durchlauf. Die übrigen Untereinheiten wurden durch Gradientenelution gewonnen (98).

d. Gewinnung von ^{32}P -markierter modifizierter bzw. alterierter α -Untereinheit

Zwei Gramm t_4^{alt} - bzw. t_4^{mod} -infizierte Bakterien, denen 15 min vor Infektion ^{32}P -markiertes anorganisches Phosphat in das Nährmedium zugesetzt worden war, wurde zweimal mit Puffer A gewaschen.

Zu den in 20 ml suspendierten Bakterien wurde 5 ml Puffer B gegeben, 10 min bei 0°C inkubiert und anschließend mit 25 ml Puffer C versetzt. Nach 10 min Inkubation bei 0°C wurde 0,5 ml 1 M Tris-HCl pH 9, 4 ml 0,4 M Mg-Acetat und 1 ml einer DNAse-RNase-Lösung (je 1 mg/ml) zugegeben und 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer (30 min bei 48000 g) wurde der Überstand mit 4 ml B'-Ziegenantiserum versetzt. Der Ansatz wurde 15 h bei 4°C stehen gelassen. Das Antikörperpräzipitat wurde dreimal mit TEG-Puffer und einmal mit TE-Puffer gewaschen.

Die Isolierung der α -Untereinheit aus den Antikörperpräzipitaten geschah durch Cellogelelektrophorese wie beschrieben (47,93,98).

e. Isolierung des Alterationsenzym

10 ml gereinigter T4-Phagen wurden nach Laemmli (91) durch Zugabe von festem NaCl bis die Lösung 5 M wurde und anschließend wiederholten Einfrieren und Auftauen in Trockeneis/Aceton lysiert.

Nach Verdau mit DNase wurde analog Rohrer et al. (63) weiter aufgearbeitet.

f. In vitro Alteration von E.coli Polymerase

50 mg RNA-Polymerase wurden mit 1,2 mg Alterationsenzym 15 h bei 15°C in 1 ml TAG-Puffer, der zusätzlich noch 0,25 mM an NAD war, inkubiert (vergl. 63). Nach Dialyse gegen HAHC-Puffer

wurde alteriertes α über Hydroxylapatit - wie unter c. beschrieben - gewonnen.

g. Carboxymethylierung

Die Carboxymethylierung mit Jodacetamid wurde wie unter (109) beschrieben durchgeführt. Carboxymethylierung mit ^3H -markierter Jodessigsäure geschah analog zu (110).

h. BrCN-Spaltung

Die BrCN-Spaltung geschah mit 100-fachem Überschuß an BrCN relativ zu den in den Peptiden enthaltenen Methioninen in 70 %iger Ameisensäure 15 h bei 4°C (vergl. 16).

i. Trypsinspaltung

Tryptische Spaltungen wurden in $0,1\text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ durchgeführt. Die Proteinkonzentration war 1 %; das Enzym/Substrat-Verhältnis war etwa 1:50 (g/g). Die Inkubationszeiten waren $2 \times 4\text{ h}$ bei 37°C .

k. Thermolysinspaltung

Die Thermolysinspaltung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die tryptische Spaltungen.

Zur Gewinnung von Th-2 bzw Th-4 wurde ein Enzym/Substrat-Verhältnis von 1:100 bei 4 h Inkubationszeit, zur Gewinnung von Th-6 ein Enzym/Substrat-Verhältnis von 1/30 bei $2 \times 3\text{ h}$ Inkubationszeit gewählt.

l. Gelchromatographie

Zur Peptidtrennung wurde Sephadex G 50 superfine, Sephadex LH 60, Sephadex G 25 superfine, Biogel P4 (-400mesh) und

Biogel P2 (-400 mesh) zu den unter Abschnitt B. erwähnten Bedingungen verwendet.

Zum Entsalzen, bzw. zum Abtrennen von Harnstoff aus Peptidlösungen wurde Sephadex G 25 medium benutzt.

m. DEAE-Cellulosechromatographie

Zur Trennung von Bromcyanpeptiden wurde DEAE-Cellulose verwendet, die mit HAHC-Puffer (CB II) bzw. 6 M Harnstoff, 0,05 M NH_4HCO_3 äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit Ammoniumhydrogencarbonatgradienten.

Zur Trennung tryptischer Peptide wurde DEAE-Cellulose verwendet, die nur mit 0,01 M NH_4HCO_3 äquilibriert war. Elution erfolgte mit Ammoniumhydrogencarbonatgradienten.

n. Präparativer Fingerprint

100-300 nM eines Peptidgemisches wurde auf eine Kieselgeldünnschichtplatte auf einer Linie quer zur Trennrichtung (3,5 cm entfernt vom Plattenrand) aufgetragen. Nach Elektrophorese zu den gleichen Bedingungen wie unter der Beschreibung des analytischen Fingerprints aufgeführt worden ist, wurden die äußeren Bereiche der Platte mit Fluorescamin oder Ninhydrin gefärbt. Die Zonen auf dem ungefärbten Teil der Dünnschichtplatte, die den auf den mit Fluorescamin bzw. Ninhydrin behandelten Bereichen gefärbten Banden entsprachen, wurden ausgekratzt und mit 10 %iger Essigsäure oder 1M NH_3 eluiert. Das einer einzelnen Bande entsprechende Peptidgemisch wurde auf eine zweite Kieselgelplatte aufgetragen und mit n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser=68/40/14/25 chromatographiert. Durch Anfärben kleiner Bereiche - wie oben beschrieben - Auskratzen und Elution wurden die sauberen Peptide isoliert.

D. ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Durch Spaltung der α -Untereinheit der RNA-Polymerase mit BrCN werden 5 Peptide erhalten, die isoliert und durch Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung und N-terminalen Sequenzen charakterisiert wurden.
- 2) Aus einem tryptischen Hydrolysat der α -Untereinheit wurden 4 tryptische Peptide durch Gelchromatographie und durch präparativen Fingerprint isoliert, von denen 3 Methionin enthielten. Die Peptide wurden durch Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung und z.T. der N-terminalen Sequenzen charakterisiert.
- 3) Durch Nachspaltung der tryptischen methioninhaltigen Peptide mit BrCN und der Bromcyanpeptide mit Trypsin und Identifizierung der daraus erhaltenen Fragmente im analytischen Fingerprint konnten die Bromcyanpeptide in der richtigen Reihenfolge einander zugeordnet werden.
- 4) Durch Vergleich der aus der vorliegenden Arbeit erhaltenen Sequenzen mit der von Ovchinnikov publizierten Primärstruktur von α (8) konnten Ovchinnikovs Resultate bestätigt werden.
- 5) Modifiziertes α liefert nach tryptischer Spaltung ein aus 28 Aminosäuren bestehendes Peptid mit 4 basischen Aminosäuren, von denen 2 in einer Arg-Pro bzw. Lys-Pro Sequenz vorliegen. Der N-terminale Bereich dieses Peptids wurde sequenziert, und so konnte dieses Peptid - zusammen mit der ermittelten Aminosäurezusammensetzung - in die Sequenz von α eingeordnet werden.
- 6) Durch Nachspaltung des tryptischen modifizierten Peptids mit Thermolysin wurden 3 einander überlappende ADP-ribosylierte Peptide erhalten, die durch Aminosäureanalyse und Bestimmung der N-Termini charakterisiert wurden.

- 7) Durch Sequenzanalyse des kleinsten thermolytischen ADP-ribosylierten Peptids konnte die in α ADP-ribosylierte Aminosäure als das Arginin 265 innerhalb der Sequenz von α identifiziert werden.
- 8) Der tryptische Verdau von alteriertem α liefert das gleiche ADP-ribosylierte Peptid, das aus modifiziertem α erhalten worden war.
- 9) Alteriertes α liefert ein zweites tryptisches ADP-ribosyliertes Peptid, dem wahrscheinlich der Ort der zweiten Alteration auf α entspricht und dem wahrscheinlich die Aminosäuren 201-219 innerhalb α entsprechen.
- 10) Aufgrund der Identität der ADP-ribosylierten Aminosäure bei Alteration und Modifikation wurde ein hypothetisches Modell entworfen, indem die Alteration und Modifikation wegen einer verringerten σ -Bindungsfähigkeit der RNA-Polymerase auf der Transkriptionsebene in den Stoffwechsel des T4-infizierten Bakteriums eingreift.

E. LITERATURVERZEICHNIS

Abkürzungen von Zeitschriftentiteln, die offiziell nicht verwendet werden:

BBRC	Biochem. Biophys. Res. Commun.
CSHSQB	Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biologie
JBC	Journal of Biological Chemistry
JMB	Journal of Molecular Biology
MGG	Mol. Gen. Genet.
BBA	Biochim. Biophys. Acta

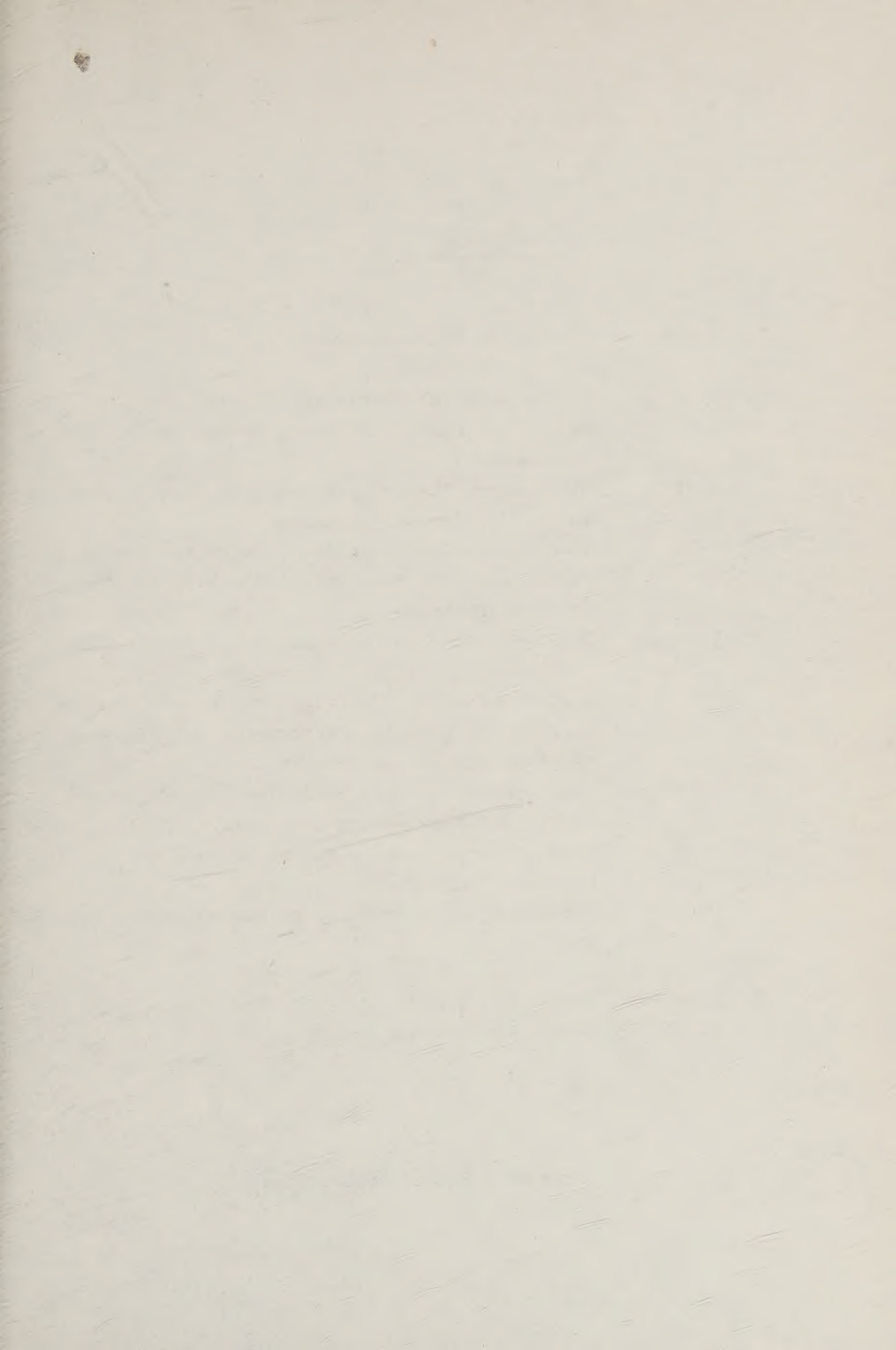
- 1) Zillig, W., Zechel, K., Halbwachs, H.-J., Hoppe Seyler's Z. Phys. Chemie 351, 221 (1970)
- 2) Travers, A., Burgess, R., Nature 222, 537 (1969)
- 3) Berg, D., Chamberlin, M., Biochemistry 9, 5055 (1970)
- 4) Berg, D., Barrett, K., Chamberlin, M., in: "Meth. Enzymol." XXI, 501 (1971)
- 5) Iwakura, Y., Ito, K., Ishihama, A., MGG 133, 1 (1974)
- 6) Engbaek, F., Gross, C., Burgess, R.R., MGG 143, 291 (1976)
- 7) Burgess, R.R., JBC 244, 6168 (1969)
- 8) Ovchinnikov, Yu.A., Lipkin, V.M., Modyanov, N.N., Chertov, O.Yu., Smirnov, Yu.V., FEBS-Letters 76, 108 (1977)
- 9) Zillig, W., Palm, P., Heil, A., in: "RNA-Polymerase", Cold Spring Harbor Laboratory (1976)
- 10) Heil, A., Zillig, W., FEBS-Letters 11, 105 (1970)
- 11) Walter, G., Seifert, W., Zillig, W., BBRC 30, 240 (1968)
- 12) Goff, C., Weber, K., CSHSQB 35, 101 (1970)
- 13) Seifert, W., Rabussay, D., Zillig, W., FEBS-Letters 16, 175 (1971)
- 14) Fujiki, H., Zurek, G., FEBS-Letters 55, 242 (1975)
- 15) Gross, E., in: "Meth. Enzymol." XI, 238 (1967)

- 16) Hirs, C.H.W., Moore, S., Stein, W.H., JBC 235, 633 (1960)
- 17) Fujiki, H., persönliche Mitteilung
- 18) Fujiki, H., Zurek, G., Journal of Chromatography 140, 129 (1977)
- 19) Edman, P., Acta Chem. Scand. 4, 283 (1950)
- 20) Edman, P., Acta Chem. Scand. 10, 761 (1956)
- 21) Gray, W.R., in: "Meth. Enzymol." XI, 469 (1967)
- 22) Edman, P., Begg, G., Eur. J. Biochem. 1, 80 (1967)
- 23) Peterson, J.D., Nehrlich, S., Oyer, P.E., Steiner, D.F., JBC 247, 4866 (1972)
- 24) Niall, H.D., in: "Meth. Enzymol." XXVII, 942 (1973)
- 25) Laursen, R.A., Eur. J. Biochem. 20, 89 (1971)
- 26) Stent, G.S., in: "Molecular Biology of Bacteriophages", W. Freeman u. Co., San Francisco (1963)
- 27) Kaempfer, R., Magasanik, B., JMB 27, 453 (1967)
- 28) Kaempfer, R., Magasanik, B., JMB 27, 475 (1967)
- 29) Hayword, W., Green, M., PNAS 54, 1675 (1965)
- 30) Rouvière, J., Wyngaarden, J., Cantoni, J., Gros, F., Kepes, A., BBA 166, 94 (1968)
- 31) Landy, A., Spiegelman, S., Biochemistry 7, 585 (1968)
- 32) Kennell, D., J. of Virology 2, 1262 (1968)
- 33) Ennis, H.L., Cohen, P.S., Virology 36, 193 (1968)
- 34) Volkins, E., PNAS 46, 1336 (1960)
- 35) Seifert, W., Quasba, P., Walter, G., Palm, P., Schachner, M., Zillig, W., Eur. J. Biochem. 9, 319 (1969)
- 36) Horvitz, R., JMB 90, 727 (1974)
- 37) Horvitz, R., JMB 90, 739 (1974)
- 38) Salzer, W., Bolle, A., Epstein, R., JMB 49, 271 (1970)
- 40) O'Farrell, P., Gold, L., JBC 248, 5502 (1973)
- 41) O'Farrell, P., Gold, L., JBC 248, 5512 (1973)
- 42) Rabussay, D., Geiduschek, E.P., in: "Comprehensive Virology" (1976)
- 43) Haselkorn, R., Vogel, M., Brown, R., Nature 221, 836 (1969)
- 44) Goff, C., JBC 249, 6181 (1974)

- 45) Zillig, W., Fujiki, H., Mailhammer, R., J. Biochem. 77, 1 (1975)
- 46) Mailhammer, R., Yang, H.L., Reiness, G., Zubay, G., PNAS 72, 4928 (1975)
- 47) Skórko, R., Zillig, W., Rohrer, H., Fujiki, H., Mailhammer, R., Eur. J. Biochem. 79, 55 (1977)
- 48) Rohrer, H., Dissertation Universität München (1976)
- 49) Mailhammer, R., Dissertation Universität München (1976)
- 50) Fasman, G.D., ed., Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd edition, CRC Press (1976)
- 51) Matsubara, H., Singer, A., Sasaki, R., Jukes, T.H., BBRC 21, 242 (1965)
- 52) Matsubara, H., Sasaki, R., Singer, A., Jukes, T.H., Arch. Biochem. Biophys. 115, 324 (1966)
- 53) Morihara, K., Tsuzuki, H., BBA 118, 215 (1966)
- 54) Matsubara, H., BBRC 24, 427 (1966)
- 55) Morihara, K., Ebata, M., J. Biochem. 61, 149 (1967)
- 56) Bradshaw, R.A., Biochemistry 8, 3871 (1969)
- 57) Jentsch, J., Z. Naturforsch. 24b, 1290 (1969)
- 58) Bergmann, M., Fruton, J.S., Pollack, JBC 127, 643 (1939)
- 59) Bergmann, M., Fruton, J.S., Advanced Enzymology 1, 63 (1941)
- 60) Hirs, C.H.W., Moore, S., Stein, W.H., JBC 219, 623 (1956)
- 61) Sugita, Gish, Young, Fraenel-Conrat, Stanly, PNAS 46, 1463 (1960)
- 62) Margoliash, Smith, Kreil, Tuppy, Nature 192, 1125 (1961)
- 63) Rohrer, H., Zillig, W., Mailhammer, R., Eur. J. Biochem. 60, 227 (1975)
- 64) Schachner, M., Seifert, W., Zillig, W., Eur. J. Biochem. 22, 520 (1971)
- 65) Regneiro, B., Amelunxen, R., Grisolia, S., Biochemistry 1, 553 (1962)
- 66) Silver, S., JMB 29, 191 (1967)
- 67) Duckworth, D.H., Bacteriological Reviews 34, 344 (1970)
- 68) Tremblay, G.Y., Daniels, M., Schaechter, M., JMB 40, 65 (1969)

- 69) Stevens, A., PNAS 69, 603 (1972)
- 70) Stevens, A., Biochemistry 13, 493 (1974)
- 71) Rabussay, D., Mailhammer, R., Zillig, W., in: "Metabolic Interconversions of Enzymes", eds. O. Wieland, E. Helmreich, H. Holzer, p. 213, Spriger Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1972)
- 72) Burgess, R., Travers, A., Dunn, J. Bautz, E.K.F., Nature 221, 43 (1969)
- 73) Sugiura, M., Okamoto, T., Takenami, M., Nature 225, 598 (1970)
- 74) Bautz, E., Bautz, F., CSHSQB 35, 227 (1971)
- 75) Hinkle, D.C., Chamberlin, M.J., CSHSQB 35, 65 (1971)
- 76) Hinkle, D.C., Chamberlin, M.J., JMB 70, 158 (1972)
- 77) Dausse, J.A., Sentenac, A., Fromageot, P., Eur. J. Biochem. 26, 43 (1972)
- 78) Dausse, J.A., Sentenac, A., Fromageot, P., Eur. J. Biochem. 31, 394 (1976)
- 79) Schachner, M., Seifert, W., Hoppe Seyler's Z. Phys. Chemie 352, 734 (1971)
- 80) Bautz, E.K.F., Dunn, J.J., BBRC 34, 230 (1969)
- 81) Epstein, R.H., Bolle, A., Steinberg, C.M., Kellenberger, E., Boy de la Tour, E., Edgar, R.S., Susman, M., Denhardt, G.H., Lielausis, A., CSHSQB 28, 375 (1963)
- 82) Bolle, A., Epstein, R.H., Salser, W., Geiduschek, E.P., JMB 31, 325 (1968)
- 83) Pulitzer, J.F., JMB 49, 473 (1970)
- 84) Pulitzer, J.F., Geiduschek, E.P., JMB 49, 489 (1970)
- 85) Horvitz, H., Nature New Biology 244, 137 (1973)
- 87) Ratner, D., JMB 89, 803 (1974)
- 88) Ratner, D., JMB 88, 373 (1974)
- 86) Stevens, A., BBRC 41, 367 (1970)
- 89) Goff, C.D., unveröffentlicht (1977)
- 90) Skórko, R., persönliche Mitteilung
- 91) Laemmli, U., Nature 227, 680 (1970)

- 92) Mirault, M.E., Scherrer, K., Eur. J. Biochem. 23, 372 (1971)
- 93) Palm, P., Heil, A., Boyd, D., Grampp, B., Zillig, W., Eur. J. Biochem. 53, 283 (1975)
- 94) Hartley, B.S., Biochem. J. 119, 805 (1970)
- 95) Woods, K.R., Wang, K.-T., BBA 133, 369 (1967)
- 96) Gottlieb, P.D., Cunningham, B.A., Rutishauser, U., Edelman, G.M., Biochemistry 9, 3155 (1970)
- 97) Chamberlin, M., McGrath, J., Waskell, C., Nature 228, 227 (1970)
- 98) Dunn, J.J., Bautz, F.A., Bautz, E.K.F., Nature New Biology 230, 94 (1971)
- 99) Fujiki, H., Palm, P., Zillig, W., Calender, R., Sunshine, M., MGG 145, 19 (1976)
- 100) Matsubara, H., Sasaki, R.M., BBRC 35, 175 (1969)
- 101) Lin, T.-Y., Chang, Y.H., JBC 246, 2842 (1971)
- 102) Sanger, F., Biochem. J. 44, 126 (1949)
- 103) Hirs, C.H.W., in: "Meth. Enzymol." XI, 197 (1967)
- 104) Otto, J., Machleidt, I., Machleidt, W., Rückl, G., Wachter, E., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 358, 927 (1977)
- 105) Fietzek, P.P., Rexrodt, F.W., Hopper, K.E., Kühn, K., Eur. J. Biochem. 38, 396 (1973)
- 107) Schaller, H., Nüsslein, C., Bonhoeffer, F.J., Kurz, C., Nietschmann, J., Eur. J. Biochem. 26, 474 (1972)
- 106) Summers, M.R., Smythers, G.W., Oroszlan, S., Anal. Biochem. 53, 624 (1973)
- 108) Bernardi, G., in: "Meth. Enzymol." XXII, 325 (1971)
- 109) Crestfield, A.M., Moore, S., Stein, W.H., JBC 238, 622 (1963)
- 110) Jörnvall, H., Harris, J.I., Eur. J. Biochem. 13, 565 (1970)



Lebenslauf

- 26.9.1948 geboren in Wilhelmshaven
- 1955-59 Besuch der Grundschule in Wilhelmshaven
- 1959-68 Besuch der Humboldt-Schule, Gymnasium in Wilhelmshaven
- 1968-71 Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie an der Universität Tübingen
- 1971-72 Studium der Chemie an der Universität Freiburg
- 1972-74 Fortsetzung des Biochemiestudiums an der Universität Tübingen
- 5.11.1974 Diplom-Prüfung in Physiologischer Chemie und Biochemie
- Diplomarbeit bei Prof. Zähler: Untersuchungen über die Wirkung des Kirromycins auf die Proteinbiosynthese bei Eukaryonten
- 1974-78 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie unter Anleitung von Prof. W. Zillig
- 1976-78 Studium der Pharmazie an der Universität München
- 25.10.1978 Zweites Staatsexamen der pharmazeutischen Prüfung
- 16.5.1975 Heirat mit Isolde, geb. Klenk
- 21.7.1977 Geburt von Tochter Katharina

Druckerei A. Staudenraus Würzburg